

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Veronika Gunjević

855/BPI

**Matematičko modeliranje biosinteze
mcl-PHA u stanicama *Pseudomonas*
citronellolis i *Pseudomonas*
*chlororaphis***

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Predraga Horvata, red. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistenta dr.sc. Maria Novaka.

Neizmjerno se želim zahvaliti iznimnom čovjeku i mom uzoru prof. dr.sc. Predragu Horvatu na pruženoj prilici za izradu ovog rada i na svemu što sam naučila prilikom njegove izrade. Hvala mu na nesebičnoj pomoći, stručnom vodstvu, strpljenju te velikom uloženom trudu i vremenu. Zahvaljujem se i asistentu dr.sc. Mariu Novaku na pomoći prilikom upoznavanja s programom u kojem je ovaj rad izrađen te na stručnim savjetima prilikom izrade ovog rada. Također, želim se zahvaliti prof. dr.sc. Martinu Kolleru na ustupljenim podacima s UNI Graz-a bez kojih ovaj rad ne bi bio napisan.

I na kraju, veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi pomagali i bodrili me u svim teškim trenucima. Posebno hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili stjecanje fakultetskog obrazovanja te mi pri tome pružili potporu i razumijevanje tijekom cijelog studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

MATEMATIČKO MODELIRANJE BIOSINTEZE *mcl*-PHA U STANICAMA *Pseudomonas citronellolis* I *Pseudomonas chlororaphis*

Veronika Gunjević, 855/BPI

Sažetak: Polihidroksialkanoati srednje duljine lanca (*mcl*-PHA) privlače sve veću pozornost kao biološki proizvedena i biorazgradiva „zelena plastika“. Za proizvodnju *mcl*-PHA korišteni su kao proizvodni mikroorganizmi bakterije *Pseudomonas chlororaphis* i *P. citronellolis*, a kao sirovina zasićeni metilni esteri masnih kiselina iz biodizela. U svrhu optimizacije proizvodnje *mcl*-PHA, detekcije određenih nepravilnosti prilikom provođenja procesa (režima pritoka izvora C i N) te u svrhu boljeg razumjevanja kinetike rasta navedenih mikroorganizama, izrađeni su formalno kinetički matematički modeli zasnovani na eksperimentalnim podacima. Modeli su temeljeni na strategiji „dva odjeljka“ biomase (biokatalitički dio i rezervne tvari) i na Leudeking-Piret odnosu između specifične brzine rasta i biosinteze proizvoda. Za modeliranje i simulacije korišten je program Berkeley Madonna. Matematički modeli se djelomično slažu s eksperimentalnim podacima. Neslaganje postoji za varijablu koncentracija rezidualne biomase (biokatalitički aktivne komponente) za period limitacije rasta izvorom dušika, a vidljivo je kao prisutan rast rezidualne biomase u dijelu uzgoja kad u podlozi nije bilo iskoristivog izvora dušika. Takav rezultat upućuje na potrebnu korekciju metode određivanja koncentracije rezidualne biomase.

Ključne riječi: srednjelančani PHA, matematičko modeliranje, formalno kinetički model, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas citronellolis*

Rad sadrži: 73 stranica, 19 slika, 6 tablica, 39 literaturnih navoda, 6 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Dr.sc. Predrag Horvat, red.prof.

Pomoć pri izradi: Dr.sc. Mario Novak, asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Mirela Ivančić Šantek
2. Prof.dr.sc. Predrag Horvat
3. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
4. Izv.prof.dr.sc. Mirjana Čurlin (zamjena)

Datum obrane: 14. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

MATHEMATICAL MODELING OF *mcl*-PHA BIOSYNTHESIS BY *Pseudomonas citronellolis* AND *Pseudomonas chlororaphis*

Veronika Gunjević, 855/BPI

Abstract: Medium chain length polyhydroxyalkanoate (*mcl*-PHA) attract increasing attention as biobased and biodegradable „green plastics“. *Pseudomonas chlororaphis* and *P. citronellolis* were selected as production strains for *mcl*-PHA production from saturated fatty acids methyl esters (excluded from biodiesel). For the optimization of the *mcl*-PHA production process, for detection of irregularities during the process and for better understanding of the growth kinetics and *mcl*-PHA biosynthesis, formal kinetic mathematical models (based on experimental data) were established. The models were based on the „two main biomass compartments strategy“ (biocatalytically active part and storage materials) as well as on the Leudeking-Piret relation between the specific growth and PHA production rate respectively. For modeling and simulation purposes Berkeley Madonna software was used. Mathematical models partially match the experimental data. There was a disagreement between the experimental concentration of the residual biomass and the simulated values in the nitrogen-limited growth phase. This disagreement is evident as the growth of residual biomass in the cultivation phase when there wasn't utilizable nitrogen source. Such results indicate the necessary correction of the biomass concentration determination method.

Keywords: *mcl*-PHA, mathematical modeling, formal kinetic model, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas citronellolis*

Thesis contains: 73 pages, 19 figures, 6 tables, 39 references, 6 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Predrag Horvat, Full Professor

Technical support and assistance: PhD. Mario Novak, Scientific Assistant

Reviewers:

1. PhD. Mirela Ivančić Šantek, Associate professor
2. PhD. Predrag Horvat, Full professor
3. PhD. Blaženka Kos, Full professor
4. PhD. Mirjana Čurlin, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 14 July 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. BIOPOLIMERI	3
2.1.1. Struktura, svojstva i primjena PHA.....	4
2.1.2. Proizvodni sojevi i kinetika sinteze PHA.....	8
2.1.3. Tehnike uzgoja proizvodnih sojeva PHA.....	12
2.2. MATEMATIČKI MODELI	12
2.2.1. Podjela modela	13
2.2.2. Matematičko modeliranje biosinteze PHA	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Mikroorganizmi.....	18
3.1.2. Hranjive podloge	18
3.1.2.1. Čvrsta podloga za uzgoj inokuluma.....	18
3.1.2.2. Uzgoj u reaktorima	18
3.1.3. Izvor ugljika (FAME).....	19
3.2. METODE.....	20
3.2.1. Uzgoj inokuluma	20
3.2.1.1. Uzgoj inokuluma <i>P. chlororaphis</i> DSM 50083 i <i>P. citronellolis</i> DSM 50332.....	20
3.2.2. Uzgoj radnih mikroorganizama i biosinteza PHA	20
3.2.2.1. Uzgoj <i>P. chlororaphis</i> DSM 50083 i biosinteza PHA.....	20
3.2.2.2. Uzgoj <i>P. citronellolis</i> DSM 50332 i biosinteza PHA	21
3.2.3. Analitičke metode	22
3.2.3.1. Analiza sastava FAME	22

3.2.3.2.	Određivanje koncentracije suhe tvari biomase	22
3.2.3.3.	Određivanje optičke gustoće	23
3.2.3.4.	Brzi test koncentracije amonijaka	23
3.2.3.5.	Precizno određivanje koncentracije amonijaka.....	23
3.2.3.6.	Izolacija <i>mcl</i> -PHA iz biomase.....	24
3.2.3.7.	Određivanje proteina.....	24
3.2.3.8.	GC-FID analiza PHA	24
3.3.	MATEMATIČKO MODELIRANJE	26
3.3.1.	Računalni program „Berkeley Madonna“ i korištene programske funkcije	26
3.3.2.	Jednadžbe primjenjene u matematičkom modelu biosinteze PHA	26
3.3.2.1.	Jednadžbe primjenjene u matematičkom modelu biosinteze PHA u stanicama <i>P. chlororaphis</i> DSM 50083	26
3.3.2.2.	Jednadžbe primjenjene u matematičkom modelu biosinteze PHA u stanicama <i>P. citronellolis</i> DSM 50332	28
3.3.3.	Parametri matematičkih modela biosinteze PHA u stanicama <i>P. chlororaphis</i> DSM 50083 i <i>P. citronellolis</i> DSM 50332.....	29
3.3.4.	Testiranje osjetljivosti matematičkih modela biosinteze PHA u stanicama <i>P. chlororaphis</i> DSM 50083 i <i>P. citronellolis</i> DSM 50332 na parametre	35
4.	REZULTATI I RASPRAVA	36
4.1.	Ključne varijable i kinetičke jednadžbe primijenjene u matematičkom modelu biosinteze PHA u stanicama <i>P. chlororaphis</i> DSM 50083 i <i>P. citronellolis</i> DSM 50332 ..	37
4.2.	Simulacija procesa biosinteze <i>mcl</i> -PHA u stanicama <i>P. chlororaphis</i> DSM 50083 i <i>P. citronellolis</i> DSM 50332 matematičkim modelom i usporedba s eksperimentalnim rezultatima.....	40
4.2.1.	Matematički model biosinteze <i>mcl</i> -PHA u stanicama <i>P. chlororaphis</i> DSM 50083 – prvi uzgoj.....	40
4.2.2.	Matematički model biosinteze <i>mcl</i> -PHA u stanicama <i>P. chlororaphis</i> DSM 50083 – drugi uzgoj.....	44

4.2.3. Matematički model biosinteze <i>mcl</i> -PHA u stanicama <i>P. chlororaphis</i> DSM 50083 – treći uzgoj	48
4.2.4. Matematički model biosinteze <i>mcl</i> -PHA u stanicama <i>P. citronellolis</i> DSM 50332 – prvi uzgoj.....	52
4.2.5. Matematički model biosinteze <i>mcl</i> -PHA u stanicama <i>P. citronellolis</i> DSM 50332 – drugi uzgoj.....	56
4.2.6. Usporedno razmatranje rezultata matematičkog modeliranja biosinteze <i>mcl</i> -PHA u stanicama <i>P. chlororaphis</i> DSM 50083 i <i>P. citronellolis</i> DSM 50332.....	60
4.3. Testiranje osjetljivosti matematičkih modela biosinteze <i>mcl</i> -PHA u stanicama <i>P. chlororaphis</i> DSM 50083 i <i>P. citronellolis</i> DSM 50332	64
5. ZAKLJUČCI	69
6. LITERATURA.....	70

1. UVOD

Polihidroksialkanoati (PHA) su poliokesteri koji se prirodno nakupljaju u mikrobnim kulturama kao rezervna tvar, odnosno izvor ugljika i energije, te se mogu proizvoditi iz obnovljivih izvora (Koller i sur., 2012; Chee i sur., 2010). Privlače sve veću pozornost kao biobazirana i biorazgrađiva zelena plastika zbog obećavajućih fizikalnih svojstava i dobre integracije njihovog životnog ciklusa u prirodno kruženje ugljika (Muhr i sur., 2013a). Među svim poznatim vrstama biopolimera sa svojstvima plastike jedino se PHA mogu u potpunosti proizvesti i razgraditi pomoću živih stanica (Koller i sur., 2012). Srednjelančani PHA (engl. *medium chain length, mcl*; građeni od monomera koji sadrže 6 – 14 atoma ugljika u bočnom lancu) imaju karakteristike elastomera, lateksa i guma. Za razliku od kratkolančanih PHA mnogo su manje kristalični, kruti i lomljivi. Zbog navedenih svojstva, *mcl*-PHA su pogodni za industrijsku obradu te su interesantni za uporabu u obliku bioloških guma i lateksa (Muhr i sur., 2013b). Najistraženiji i trenutno najbolji *mcl*-PHA-proizvodni mikroorganizmi su bakterije iz roda *Pseudomonas* (Koller i Muhr, 2014). Stoga su na Graz University of Technology, zbog izuzetno ohrabrujućih značajki, kao radni mikroorganizmi odabrane bakterije *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332. Izvor ugljika za rast biomase i sintezu PHA bio je otpadni materijal – metil esteri masnih kiselina dobiveni pročišćavanjem iz biodizela životinjskog podrijetla. Zbog visokih troškova proizvodnje, PHA još uvijek nisu konkurenti petrokemijskoj plastici (Koller i sur., 2012). Zato je proces proizvodnje PHA potrebno optimirati i dodatno istražiti. Kao koristan alat u optimiranju i kontroli proizvodnje i metabolizma ističe se matematičko modeliranje (Novak i sur., 2015). Osim toga, matematičko modeliranje biosinteze PHA zasnovano na eksperimentalnim podacima omogućava bolje razumijevanje metabolizma PHA-proizvodnih mikroorganizama (Koller i sur., 2012).

U ovom radu izrađeni su formalno kinetički matematički modeli biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* i *P. citronellolis*. Modeli su bili zasnovani na eksperimentalnim podacima uzgoja navedenih bakterija, dobivenim od Graz University of Technology. Svrha ovih modela bila je uspostava optimizacije samog procesa proizvodnje *mcl*-PHA detekcijom određenih nepravilnosti tijekom procesa, kao i bolje razumijevanje kinetike rasta proizvodnih mikroorganizama i kinetike biosinteze *mcl*-PHA. Testirana je i osjetljivost navedenih matematičkih modela na promjenu parametara. Time se dobio uvid u samu prilagodljivost

matematičkog modela mogućim stvarnim situacijama u procesu. Za izradu matematičkih modela, programiranje i matematičke simulacije korišten je računalni program Berkeley Madonna (varzija 8.2.21) koji izuzetno brzo rješava diferencijalne jednačbe i sustave običnih diferencijalnih jednačbi (Macey i Oster, 2016).

2. TEORIJSKI DIO

2.1.BIOPOLIMERI

Polimeri su makromolekule nastale povezivanjem manjih molekula, monomera, kovalentnom vezom (Park i Lakes, 2007). Polimeri mogu biti prirodni, npr. celuloza, modificirani prirodni polimeri, ili sintetski polimeri koji mogu biti sintetizirani iz prirodnih izvora ili fosilnih sirovina (Rochow i Rochow, 1976). Polimeri direktno ekstrahirani iz prirodnih izvora ili proizvedeni iz obnovljivih izvora nazivaju se biopolimerima (Bugnicourt i sur., 2014; Peelman i sur., 2015). U izradi različitih vrsta plastike, pretežiti dio mase čine upravo polimeri (Rochow i Rochow, 1976). S rastućim brojem stanovnika, potreba za plastikom je posljedično sve veća i svake godine se proizvede otprilike 200 milijuna tona petrokemijske plastike. Zbog sve većeg nedostatka nafte, proizvodnja petrokemijske plastike postaje jako skupa i neodrživa. Kao rezultat toga, postavlja se potreba za korištenjem alternativnih, održivih sirovina za proizvodnju plastike (Du i sur., 2012). Biopolimeri prema tome imaju veliku važnost u održivom razvoju tako što pridonose očuvanju fosilnih resursa i smanjenu emisije ugljičnog dioksida, a pošto su najčešće i biorazgradivi, ne štete okolišu (Bugnicourt i sur., 2014; Du i sur., 2012).

Biopolimeri se mogu podijeliti u tri kategorije:

1. Polimeri direktno ekstrahirani iz biomase biljaka i životinja (Peelman i sur., 2015), a oni se dalje mogu podijeliti na polisaharide, lignin (polimerni materijali sastavljeni iz 3-fenilpropanolskih jedinica tj. koniferilnog, kumarilnog i sinapilnog alkohola), proteine (prirodni poliamidi aminokiselina), prirodni kaučuk i prirodne smole (Andričić, 2009),
2. Polimeri sintetizirani iz monomera biološkog podrijetla, kao što su polilaktična kiselina (engl. *polylactic acid*, PLA) i biopolietilen,
3. Polimeri proizvedeni direktno iz mikroorganizama, odnosno polihidroksialkanoati (engl. *polyhydroxyalkanoates*, PHA) (Peelman i sur., 2015).

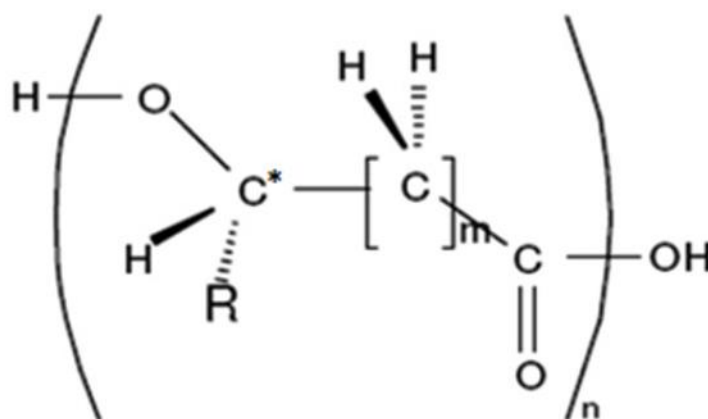
Uz bioplimere, proizvođači plastike i stručna javnost uvode i pojam zelena plastika. Kako bi se plastika mogla zvati zelenom plastikom mora biti svrstana u jednu od sljedećih kategorija materijala: biobazirani, biorazgradivi, kompostabilni i biokompatibilni materijal. Klasifikacija u navedene kategorije se provodi prema standardiziranoj normi CEN/TR 15932 (2010). Materijal (plastika) se može smatrati biorazgradivim ukoliko se 90 % njegovog

ugljika biološki metabolizira unutar 180 dana. Isto tako, (plastični) materijal se može smatrati kompostabilnim ukoliko manje od 10 % materijala ostaje na situ s porama veličine 2 mm nakon 180 dana kompostiranja. Kategorija biokompatibilnih materijala se odnosi na (plastične) materijale kod kojih je dokazana njihova netoksičnost na žve mikroorganizme i okoliš. Polimer se uvrštava u kategoriju biobaziranih materijala, odnosno biopolimera, ukoliko njegovi monomeri potječu iz obnovljivih izvora; polimerizacija zatim može biti biološka ili kemijska (Koller i sur., 2012).

Među biopolimerima, PHA privlače sve veću pozornost kao biobazirana i biorazgradiva zelena plastika zbog dobre integracije životnog ciklusa u zatvoreno kruženje ugljika u prirodi i svojih obećavajućih tehnoloških svojstava materijala. Stoga PHA predlažu kao zamjena za petrokemijsku plastiku (Muhr i sur., 2013a).

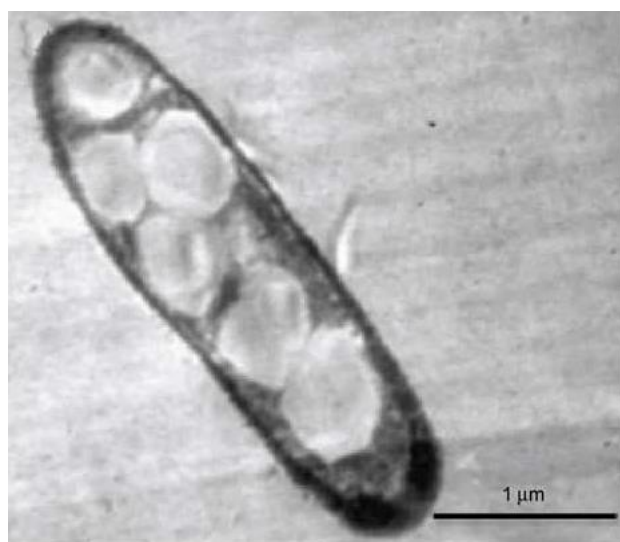
2.1.1. Struktura, svojstva i primjena PHA

PHA su polioleksoesteri koji se prirodno nakupljaju u mikrobnim kulturama kao rezervna tvar, izvor ugljika i energije te se mogu proizvoditi iz obnovljivih izvora (Koller i sur., 2012; Chee i sur., 2010). Među svim poznatim vrstama biopolimera sa svojstvima plastike, jedino se PHA mogu u potpunosti proizvesti i razgraditi pomoću živih stanica (Koller i sur., 2012). Mogu se proizvesti iz obnovljivih izvora prve generacije (npr. žitarica, šećerne repe, šećerne trske, škroba, jestivih ulja) i druge generacije (npr. melase, lignoceluloznih ostataka, sirutke, biodizela i nusproizvoda proizvodnje biodizela – glicerola i otpadnih lipida) (Novak i sur., 2015). PHA se većinom sastoje od 3-hidroksialkanoata (3HA) kao monomera. 3HA su najčešće enantiomerno čisti, *R*-konfigurirani monomeri. Struktura 3HA prikazana je na **slici 1** (Koller i sur., 2012).

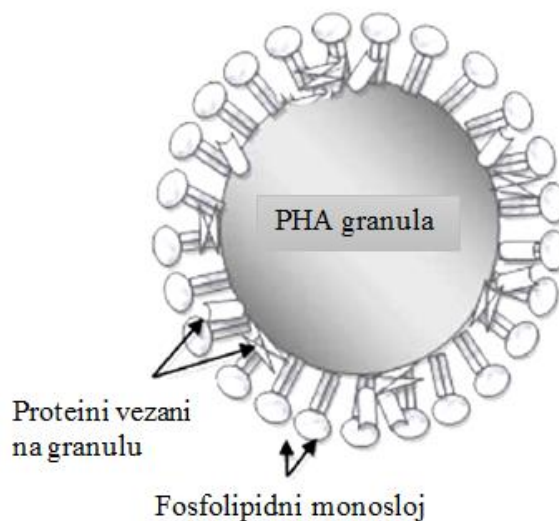


Slika 1. Opća kemijska struktura 3HA. Zvijezdica (*) prikazuje kiralni centar (Koller i sur., 2012).

PHA se nakuplja u obliku granula unutra stanične citoplazme bakterijske stanice. Prosječni promjer takve granule je od 0,2 – 0,5 μm . Mikroskopskom analizom je utvrđeno da je granula PHA obavijena proteinskim i fosfolipidnim monoslojem. Prikaz inkluzija PHA unutar stanice promatrane pod transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM), te shematski prikazana granula PHA nalaze se na **slici 2** (Kunasundari i Sudesh, 2011). Pod mikroskopom, granule su vidljive kao svijetle i neprozirne (Koller i sur., 2012).



(a)



(b)

Slika 2. (a) Morfologija PHA u bakterijskim stanicama pod TEM; (b) Model koji predstavlja nativnu PHA granulu s proteinskim monoslojem na površini (Kunasundari i Sudesh, 2011).

PHA se obično dijele prema broju atoma ugljika u njihovim monomerima (Wei i sur., 2011). Tako razlikujemo kratkolančane (engl. *short chain lenght, scl*), srednjelančane (engl. *medium chain lenght, mcl*) i dugolančane (engl. *long chain lenght, lcl*) PHA (Muhr i sur., 2013a; Lu i sur., 2009). Monomeri *scl*-PHA u bočnom lancu svojih monomera, sadrže od 3 do 5 ugljikovih atoma, a najvažniji predstavnici ove skupine PHA su polihidroksibutirat i polihidroksivalerat (Muhr i sur., 2013a; Wei i sur., 2011). Prema svojim fizikalnim svojstvima, *scl*-PHA predstavljaju klasične termoplaste i zbog toga mogu konkiurirati polietilenu, polipropilenu i PLA (Muhr i sur., 2013b). Monomeri *mcl*-PHA sadrže od 6 do 14 ugljikovih atoma u bočnom lancu svojih monomera. *mcl*-PHA posjeduju karakteristike elatomera, lateksa i guma (Muhr i sur., 2013a). Najatraktivnija karakteristika *mcl*-PHA je mogućnost prilagodbe njegovih bočnih lanaca monomera tijekom samog uzgoja mikroorganizma producenta uzgojem na supstratima koji sadrže odgovarajuću kemijsku strukturu. Štoviše, neki se bočni lanci mogu i kemijski modificirati (Kim i sur., 2007). Općenito, fizikalna svojstva PHA ovise o njihovoj strukturi, odnosno o broju ugljikovih atoma u monomeru te je mogućnost poboljšanja fizikalnih svojstava modifikacijom monomera izuzetno poželjna karakteristika (Bugnicourt i sur., 2014). Usporedba svojstva *scl*-PHA i *mcl*-PHA prikazana je u **tablici 1**.

Tablica 1. Usporedba svojstava *scl*-PHA i *mcl*-PHA (Muhr i sur., 2013b; Bugnicourt i sur., 2014).

Svojstvo	Vrijednost	
	<i>mcl</i> -PHA	<i>scl</i> -PHA
Temperatura staklastog prijelaza (T_g) [°C]	- 40	2
Temperatura taljenja (T_m) [°C]	60	160 – 175
Stupanj kristaličnosti X_{cr} [%]	< 40	40 – 60
Molekulska masa (M_r) [kDa]	< 100	> 100
Istezanje pri lomu ε [%]	100	1 – 15
Vlačna čvrstoća σ [MPa]	10	15 – 40

Zbog visoke vrijednosti istezanja pri lomu *mcl*-PHA su mnogo manje kruti od *scl*-PHA te ih je stoga lakše oblikovati. Uz to, *mcl*-PHA se odlikuju mnogo manjim stupnjem kristaličnosti od *scl*-PHA te su stoga manje krhki (Muhr i sur., 2013b; Bugnicourt i sur., 2014). Zbog svoje izrazito niske temperature staklastog prijelaza (temperatura pri kojoj amorfni polimeri prelaze iz staklastog stanja u stanje slično kaučuku, savitljivo i elastično, ali još uvijek čvrsto), *mcl*-PHA ne postaju lomljivi čak ni ispod temperature leđišta. Zbog navedenih svojstava *mcl*-PHA su interesantni za uporabu kao lateksi ili gume (Muhr i sur., 2013b).

PHA posjeduju i neke zajedničke opće karakteristike:

- netopljivost u vodi i relativno visoka otpornost na hidrolizu,
- otpornost na UV zračenje, ali osjetljivost na kiseline i baze,
- topljivost u kloroformu i ostalim kloriranim ugljikovodicima,
- biokompatibilnost,
- netoksičnost,
- manja "ljepljivost" od tradicionalnih polimera kad se rastope (Bugnicourt i sur., 2014).

Iz svega navedenog vidljivo je da je PHA vrlo svestran materijal koji privlači pozornost različitih grana industrije. Ovi biopolimeri se mogu primijeniti za pakiranje, posebno u područjima u kojima je poželjna ambalaža koja se može kompostirati, primjerice u prehrambenoj industriji (Koller i sur., 2012). PHA su iznimno poželjni u pakiranju lako kvarljive hrane, gdje je korisna visoka nepropusnost PHA filmova za kisik, koju klasični polimeri nemaju. Također je kod primjene u pakiranju hrane, korisna i njihova visoka nepropusnost za ugljikov dioksid, arome okusa, vlagu i visoka otpornost na UV zračenje (Koller, 2014). PHA se također koriste i u medicini, kao implantanti, kirurške igle, vijci i šavovi, kao nosači matrice za kontrolirano otpuštanje lijeka, a posebno u tkivnom inženjerstvu kao matrica za rast stanica u *in vitro* uvjetima. Kod medicinske primjene iznimno je korisna njihova biokompatibilnost (Koller i sur., 2012; Chee i sur., 2010). Za primjenu PHA u obliku plastike, PHA se mogu obraditi već poznatim tehnikama za obradu petrokemijske plastike (valjanje, brizganje).

PHA se ne mora primijeniti samo kao plastika. Hidrolizom PHA na njegove monomere dobija se smjesa enantiomera iste konfiguracije koja se može koristiti u farmaceutskoj industriji kao ishodišni materijal za sintezu finih kemikalija kao što su feromoni, vitamini, antibiotici i ostali farmaceutski proizvodi. PHA se mogu konvertirati u alkil estere

tranesterifikacijom, čime nastaju 3-hidroksialkanoat-metil-esteri (3HAME). Testiranjem 3HAME kao motornih goriva, dobiveni su rezultati prema kojima je toplina dobivena izgaranjem 3HAME gotovo ista onoj dobivenoj izgaranjem benzina (Koller i sur., 2012).

2.1.2. Proizvodni sojevi i kinetika sinteze PHA

U **tablici 2** navedeni su rodovi bakterija koji imaju biosintezu PHA.

Tablica 2. Prikaz rodova bakterija koji sintetiziraju PHA (Lu i sur., 2009).

Gram-pozitivne bakterije			
<i>Actinomyces</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Caryophanon</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Rhodococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptomyces</i>	
Gram-negativne bakterije			
<i>Acinetobacter</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Aphanocapsa</i>	<i>Aphanothece</i>
<i>Asticcaulus</i>	<i>Azomonas</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Beijerinckia</i>	<i>Beneckea</i>	<i>Caulobacter</i>
<i>Chloroflexus</i>	<i>Chlorogloea</i>	<i>Chromatium</i>	<i>Chromobacterium</i>
<i>Derxia</i>	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Ferrobacillus</i>
<i>Gloeotheca</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Haloferax</i>
<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Lamprocystis</i>	<i>Lampropaedia</i>	<i>Leptothrix</i>
<i>Methanomonas</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Methylomicrobium</i>
<i>Methylomonas</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Methylovibrio</i>	<i>Microcoleus</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Nitrococcus</i>
<i>Oceanospirillum</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Protomonas</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhodobacter</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Rhodospirillum</i>	<i>Sphaerotilus</i>	<i>Spirillum</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Stella</i>	<i>Syntrophomonas</i>	<i>Tetrahymena</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Thiocapsa</i>	<i>Thiocystis</i>	<i>Thiodicotyon</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Thiosphaera</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Xanthobacter</i>	<i>Zoogloea</i>

Osim bakterija, PHA mogu sintetizirati genetski modificirani kvasac i biljke (Novak i sur., 2015).

Za mikroorganizme producente, PHA izvršavaju važne biološke funkcije. Najistaknutija je njihova funkcija „skladištenja“ energije i ugljika – u uvjetima gladi uslijed nedostatka izvanstaničnog izvora ugljika, ove rezerve se mogu koristiti kao izvor ugljika i

energije. PHA su također važni za regulaciju uravnoteženog unutarstaničnog energetskog toka, za npr. staničnu pokretljivost, i za ciljanu raspodjelu rezervi ugljika do različitih metaboličkih puteva. Nadalje, postoji i tek nedavno razjašnjena uloga PHA u zaštiti stanice u ekološki stresnim uvjetima kao što su osmotski šok, UV zračenje, isušivanje, toplinski i oksidativnih stres. Uz navedeno, uključeni su u specifična metabolička zbivanja poput sporulacije, germinacije, kontrole izlučivanja egzopolisaharida i sličnog (Koller i sur., 2012).

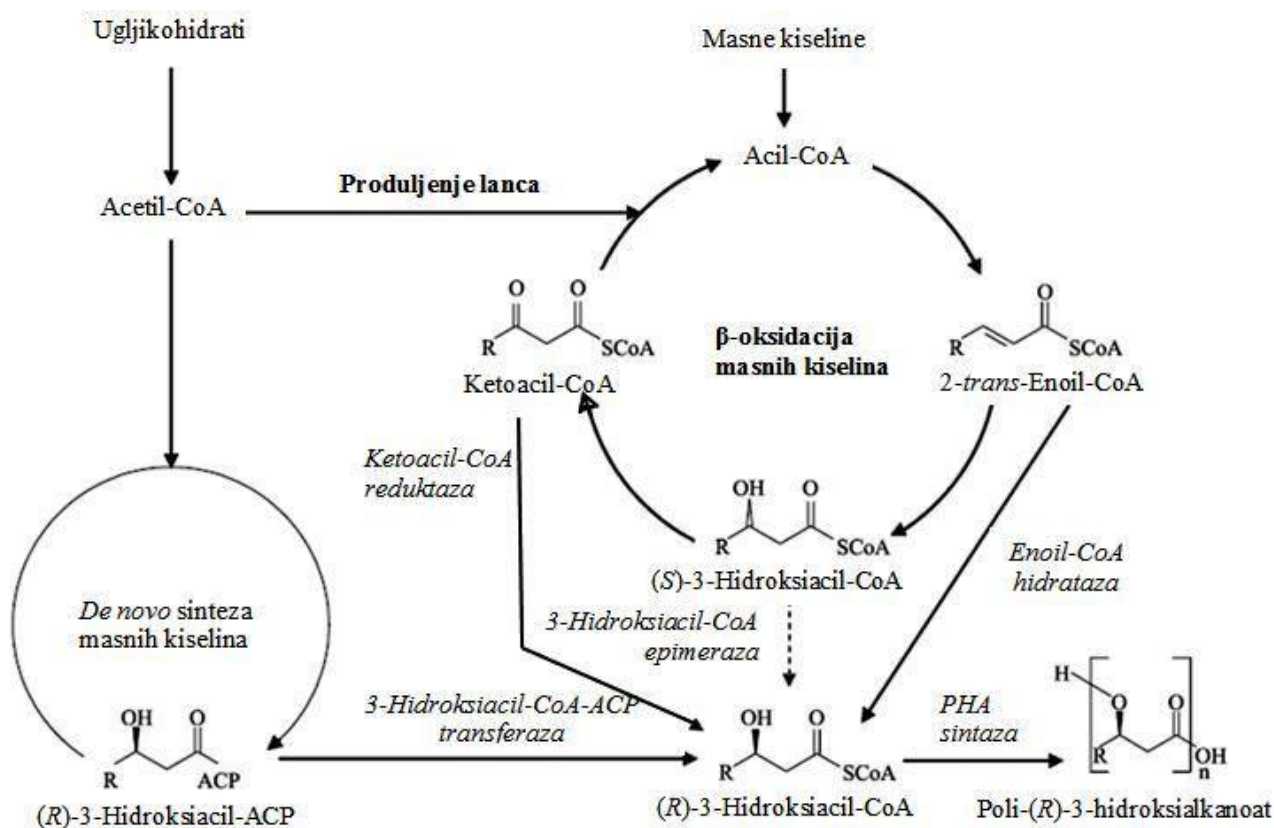
Ovisno o tipu kinetike mikrobnog rasta i proizvodnje PHA, možemo razlikovati tri skupine mikroorganizama proizvođača PHA:

- a) Sojevi kod kojih je faza biosinteze PHA strogo odjeljena od faze rasta; faza proizvodnje PHA potiče se limitacijom rasta izvorima dušika ili fosfora u hranjivoj podlozi uz suvišak izvora ugljika (npr. *Pseudomonas* sp. 2F i *Methylomonas extorquens*).
- b) Sojevi kod kojih je faza biosinteze PHA djelomično vezana uz fazu rasta; u fazi eksponencijalnog rasta proizvode PHA do određene koncentracije, dok u fazi stacionarnog rasta, koja je potaknuta limitacijom rasta izvorima dušika ili fosfora u hranjivoj podlozi (uz suvišak izvora ugljika) nakupljaju PHA u povećanoj koncentraciji (npr. *Cupriavidus necator*).
- c) Sojevi kod kojih je faza biosinteze PHA u potpunosti vezana uz fazu rasta; u fazi eksponencijalnog rasta sintetiziraju velike količine PHA neovisno o limitaciji rasta esencijalnim supstratima za rast u hranjivoj podlozi (npr. *Azohydromonas lata* DSM 1122 i *Pseudomonas putida* GPO1 ATTC 29347) (Novak i sur., 2015).

Izbor mikroorganizma za biosintezu PHA temelji se na nekoliko čimbenika kao što su: sposobnost mikroorganizma da metabolizira jeftine izvore ugljika, brzina rasta, brzina biosinteze polimera te maksimalna moguća količina akumuliranog biopolimera (Khanna i Srivastava, 2005). Također, potrebno je razmotriti način izolacije PHA iz mikroorganizma nakon proizvodnje, pošto troškovi izolacije ponekad mogu iznositi čak 40 % od ukupne cijene proizvodnje PHA (Khanna i Srivastava, 2005; Marsudi, 2006). Kao najbolji proizvodni mikroorganizam *scl*-PHA ističe se *Cupriavidus necator*, dok su najpoznatiji proizvodni mikroorganizmi *mcl*-PHA bakterije iz roda *Pseudomonas* (Khanna i Srivastava, 2005). Nistraženiji proizvođač *mcl*-PHA iz roda *Pseudomonas* je *Pseudomonas putida* (Koller i Muhr, 2014).

Biosinteza *mcl*-PHA u bakterijama odvija se preko tri različita puta u kojima se sintetiziraju prekursori za *mcl*-PHA (**slika 3**):

- Ukoliko se uzgoj vrši na supstratima kao što su glukoza i glukonat, biosinteza *mcl*-PHA odvija se preko prekursora (*R*)-3-hidroksiacil-CoA dobivenog preko puta *de novo* biosinteze masnih kiselina.
- Tijekom rasta na supstratima kao što su na primjer n-alkanske kiseline ili n-alkani, formiranje *mcl*-PHA se odvija preko β -oksidacijskog puta.
- Ukoliko se uzgoj odvija na supstratima kao što su glukoza i glukonat, može se odvijati i produljivanje lanca acil-CoA s acetil-CoA te daljnja razgradnja acil-CoA u β -oksidacijskom putu.



Slika 3. Metabolički putevi biosinteze *mcl*-PHA (Kim i sur., 2007).

U završnom koraku biosinteze *mcl*-PHA, *mcl*-PHA sintaza, za koju kodira gen PhaC, katalizira konverziju (*R*)-3-hidroksiacil-CoA u *mcl*-PHA uz otpuštanje CoA. U bakterijama roda *Pseudomonas* do sada su identificirana dva gena koji kodiraju za *mcl*-PHA sintazu – *phaC1* i *phaC2* (Kim i sur., 2007).

2.1.3. Tehnike uzgoja proizvodnih sojeva PHA

Tehnike uzgoja proizvodnih sojeva ovise o njihovoj kinetici rasta i kinetici biosinteze PHA. Prema tome, mogu se primijeniti sljedeće tehnike uzgoja: šaržni proces, šaržni proces s pritokom supstrata, ponavljani šaržni proces, ponavljani šaržni proces s pritokom supstrata, te jedno-, dvo- ili višestupanjski kontinuirani proces. Tijekom proizvodnje može se primijeniti čistu ili mješovitu kulturu mikroorganizama. Mikroorganizmi proizvođači PHA koji pripadaju skupinama navedenim pod a) i b) u poglavlju 2.1.2., visoku produktivnost PHA postižu u dvostupanjskom kontinuiranom procesu i šaržnom procesu s pritokom supstrata (Novak i sur., 2015). U prvoj fazi ovakvih procesa uzgoja postiže se željena koncentracija biomase mikroorganizma proizvođača PHA, dok se u drugoj fazi esencijalni nutrijenti (najčešće dušik i fosfor) održavaju na koncentracijama koje limitiraju rast biomase, čime se omogućava sinteza PHA iz suviška izvora ugljika. Tijekom faze limitacije esencijalnim nutrijentima, masa rezidualne biomase (definirana kao masa stanica od koje je oduzeta masa sintetiziranog PHA) ostaje gotovo konstantna, dok se ukupna masa biomase povećava samo zbog intracelularnog nakupljanja PHA (Khanna i Srivastava, 2005).

Najveći problem zamjene petrokemijske plastike s PHA je cijena proizvodnje PHA koja je mnogo veća od cjelokupne cijene proizvodnje petrokemijske plastike. Kontinuirani proces proizvodnje PHA je održiva strategija smanjenja troškova proizvodnje. Općenito, kontinuiranim procesima u biotehnologiji moguće je ostvariti mnogo veću produktivnost, niže troškove proizvodnje i konstantnu proizvodnju produkta. Međutim, za proizvodnju PHA još su uvijek najčešće u uporabi šaržni proces i šaržni proces s pritokom supstrata (Horvat i sur., 2013).

2.2. MATEMATIČKI MODELI

Matematički model sustava (biotehnološkog procesa definiranog kao tehnički proizvodni sustav) je matematički izraz, odnosno izrazi (matematičke jednadžbe, statističke relacije, računalni programi) kojima se određuje interakcija okoline (ulazne veličine) i stanja sustava (veličine stanja) i svrha upravljanja (izlazne veličine) (Kurtanjek, 2003). Drugim riječima, matematičko modeliranje je opisivanje osnovnih značajki određenog sustava pomoću matematičkih izraza (Gierisch, 2000).

U biotehnologiji, matematičko modeliranje je koristan alat za optimiziranje proizvodnje i kontrolu metabolizma mikroorganizma, te ima vrlo istaknuti značaj (Novak i sur., 2015). Na osnovi matematičkih modela vrši se:

- analiza odziva mjernih sustava u biotehnološkim procesima,
- procjena parametara i direktno nemjerljivih stanja procesa,
- prijenos rezultata procesa iz laboratorijskog mjerila u poluindustrijsko i industrijsko mjerilo,
- projektiranje novih procesa,
- nadzor procesa,
- očuvanje kakvoće proizvoda,
- upravljanje (automatizacija) procesa,
- optimiranje procesa (Kurtanek, 2003).

Tijekom formuliranja modela, nužno je da se u obzir uzmu sve kompleksne uzročno-posljedične sekvence koje imaju utjecaj na sam proces. Rezultati simulacije modela često mogu objasniti i zašto se određeni fenomeni javljaju u praksi – samim time matematički modeli pomažu boljem razumjevanju samog procesa (Dunn i sur., 2003). Povezivanjem matematičkog modela s eksperimentalnim podacima mjerenim tijekom uzgoja mikroorganizama može se osigurati preciznost eksperimentalnih rezultata, ali i otkriti nove značajke fiziologije mikroorganizama (Horvat i sur., 2016).

2.2.1. Podjela modela

Teorija modela svrstava modele u nekoliko kategorija i njima suprotnih protukategorija: deskriptivni / eksplanatorni, deterministički / stohastički, diskretni / kontinuirani, verbalni / neverbalni, nestrukturani / strukturini modeli, modeli crne / sive / bijele kutije, nematematički / matematički, distribuirani / usredotočeni modeli. Navedene se klase dalje mogu kombinirati, a izvedeni modeli se, prema svojstvima, mogu grupirati u dinamičke, kinetičke, logističke i kibernetičke modele (Horvat i sur., 2016). Obično, model razvijen iz biološkog događaja u živim sustavima može pripadati u više grupa modela (Novak i sur., 2015). Takav primjer je dinamički model koji ima karakteristike strukturnih, matematičkih, kontinuiranih i usredotočenih modela. Suprotno, kinetički se modeli mogu podijeliti u samo dvije grupe – nestrukturani i strukturni modeli (Horvat i sur., 2016). Nestrukturani kinetički modeli su u literaturi poznati i kao formalno kinetički i mehanistički modeli (Novak i sur.,

2015). Ovi modeli su konstruirani prema kemijsko-kinetičkom pristupu i ne razlikuju živi sustav ili stanicu od kemijskog sustava (Patnaik, 2005). Najjednostavniji su u skupini kinetičkih modela pa su zbog toga i danas često u upotrebi (Horvat i sur., 2016). Strukturni se modeli mogu podijeliti u sljedeće grupe: morfološke, metaboličke, odjelne te kemijski povezane modele (Novak i sur., 2015). Izbor matematičkog modela ovisi o razini inženjerskog znanja i složenosti samog procesa kojeg se želi modelirati (Kurtanjek, 2003).

2.2.2. Matematičko modeliranje biosinteze PHA

U skorije vrijeme, evidentirano je nekoliko stotina mikroorganizama proizvođača PHA. Ovi su mikroorganizmi uzgajani na vrlo različitim supstratima, te je uzgoj proveden uporabom različitih tehnika uzgoja. Ukoliko ovoj činjenici pridodamo raznolikost proizvoda, npr. duljinu lanca PHA, sastav monomera u polimeru, intermolekularna polimerna struktura itd., očit je rezultat velikog broja mogućih veza između mikroorganizama, supstrata, produkata, kinetičkih svojstava i tehnika uzgoja. Samim time postoji širok spektar različitih modela koji opisuju biosintezu PHA (Horvat i sur., 2016).

U ranijim fazama matematičkog modeliranja biosinteze PHA najčešće su korišteni formalno kinetički modeli koji su bili usmjereni na kinetičke odnose između supstrata, produkta i biomase mikroorganizma. Dakle, u ovoj ranoj fazi optimizacija samog procesa proizvodnje PHA nije bila glavna svrha modeliranja (Novak i sur., 2015). Tijekom tadašnjeg uzgoja mikroorganizama proizvođača PHA, kao supstrat koji limitira rast koristio se izvor ugljika, dok su svi ostali nutrijenti bili raspoloživi u visokim koncentracijama. Ova tehnika nije bila optimalna za mikroorganizme navedene u poglavlju 2.1.2. pod a) i b) (Horvat i sur., 2016). Ovakvi su modeli kasnije korigirani razvojem strategije s „dva glavna odijeljka“ koja je u uporabi i danas. Prvi je odjeljak katalitički (u literaturi poznat kao rezidualna biomasa), dok je drugi odjeljak sam biopolimer. Uz to, zapažen je pozitivan utjecaj limitacije rasta mikroorganizama izvorima dušika i/ili fosfora na prinos PHA tijekom uzgoja sojeva navedenih pod a) i b) u poglavlju 2.1.2. Uvođenjem ovih novih limitirajućih supstrata, mijenjali su se i matematički izrazi za specifičnu brzinu rasta mikroorganizama i specifičnu brzinu biosinteze PHA. Stoga se za matematičko definiranje specifične brzine rasta uporabila tzv. više-supstratna Monodova jednadžba. Nadalje, pronalaskom mnogih novih sojeva mikroorganizama proizvođača PHA te korištenjem različitih jeftinih supstrata s ciljem smanjenja troškova proizvodnje PHA, bilo je potrebno promijeniti i matematičke jednadžbe (modele) za specifičnu brzinu biosinteze PHA. Zbog toga je u jednadžbe uvedena inhibicija

supstratom – odnosno, inhibicija rasta mikroorganizma izvorom ugljika u suvišku, te inhibicija proizvodnje PHA izvorom dušika i/ili fosfora. Također, naknadno je dodan i izraz za specifičnu brzinu potrošnje izvora ugljika za energiju održavanja (uobičajeno jednostavna Monodova jednadžba). Isto tako, modeli su prošireni i jednadžbom koja prikazuje utjecaj razine otopljenog kisika u podlozi na rast mikroorganizma. Primijećeno je i da određeni mikroorganizmi prestaju sintetizirati PHA kada njegov maseni udio u stanici dođe na određenu maksimalnu razinu. Tako su u formalno kinetičke modele uvedene logističke jednadžbe koje opisuju ovu pojavu. Ukoliko su metabolički putevi biosinteze PHA kod određenog mikroorganizma proizvođača nepoznati, modeliranje primjenom formalno kinetičkih modela je najbolja opcija (Novak i sur., 2015).

Dinamički modeli su prikladan alat za prikazivanje različitih prijelaznih stanja prisutnih tijekom rasta mikroorganizama kao što su npr. prijelazna stanja između lag faze i eksponencijalne faze, te između eksponencijalne faze i stacionarne faze rasta (Horvat i sur., 2016). Ovi modeli u obzir uzimaju vremenski ovisne promjene u stanju sustava. Stoga su obično napisani u obliku sustava diferencijalnih jednadžbi, a u slučaju biosinteze PHA, obično su strukturirani. Nadalje, dinamički modeli, za razliku od formalno kinetičkih, u obzir uzimaju i genetički faktor i individualnost svake stanice (Novak i sur., 2015). Ovi modeli dakle, sadrže osnovne informacije o mikrobnim procesima kao što su enzimske reakcije, interakcije između DNA i proteina te međusobne interakcije između različitih proteina. Dinamički model moguće je razviti kombiniranjem poznate stehiometrije reakcija s kinetičkim svojstvima i mrežom metaboličkih puteva (Horvat i sur., 2016).

U modeliranju biosinteze PHA također su korišteni metabolički matematički modeli. Metaboličke matematičke modele odlikuje karakteristika da su namjenjeni odražavanju stvarnog fiziološkog stanja stanice. U pogledu složenosti, metabolički modeli se odnose na vrlo širok spektar različitih slučajeva: od jednostavnih slučajeva, gdje se istražuje metabolički put s najmanje dvije ili tri enzimske reakcije, do više ili manje kompliciranih metaboličkih mreža koje predstavljaju glavne kataboličke i anaboličke puteve staničnog metabolizma (Novak i sur., 2015). Ukoliko metabolički model namjerava opisati prijelazna stanja unutar visoko sofisticiranih metaboličkih mreža koje se mogu sastojati od velikog broja reakcija, u model treba umetnuti međusobno povezane puteve kao i kontrolu metabolizma i biološke regulatore. Nažalost, rijetkost je da su regulacijski mehanizmi u potpunosti poznati i definirani. Ovo je glavni razlog zbog kojeg je, s današnjim znanjem, za određene biološke sustave nemoguće uspostaviti potpuno razvijen metabolički model. Metabolički matematički

modeli koji se odnose na PHA-sintetizirajuće mikroorganizme važni su za razjašnjenje biosinteze PHA, regulacije metabolizma i načina unošenja supstrata u stanicu te su neizbježni u dobivanju novih sojeva proizvođača PHA (Horvat i sur., 2016). Među metaboličkim modelima, mogu se nalaziti kinetički modeli (koji se obično zasnivaju na enzimskoj i/ili mikrobnj kinetici, kao i na stehiometriji metaboličkih reakcija), stehiometrijski modeli (temeljeni na vremenski neovisnim karakteristikama metaboličkih mreža) i kibernetički modeli (temeljeni na optimalnoj prirodi mikrobnih procesa i na regulaciji metabolizma preko kibernetičkih okvira koji se moraju razlikovati od čistih kinetičkih događanja). Također, u upotrebi su i hibridni metabolički modeli koji sadržavaju karakteristike najmanje dva gore navedena modela (Novak i sur., 2015). Glavna značajka kinetičkih metaboličkih modela je da su formulirani prema načelima kinetike biokemijskih reakcija. Ako bi bile dostupne informacije o svim enzimskim reakcijama koje se nalaze u metaboličkoj mreži određenog mikroorganizma, bilo bi moguće napraviti i primijeniti detaljan model za interpretaciju eksperimentalnih rezultata te predvidjeti dinamičke promjene u stanicama tijekom kultivacije u hranjivoj podlozi. Međutim, informacije o regulaciji metabolizma i kinetičkim parametrima reakcija su često nepoznate pa su ovi modeli obično ograničeni na određeni biološki događaj, npr. na ustaljene metaboličke flukseve tijekom eksponencijalne faze rasta, degradaciju PHA u uvjetima limitacije izvorom ugljika, ili aktivnosti stanice tijekom mirovanja. Stehiometrijske metaboličke modele karakterizira primjena striktnih stehiometrijskih veza s obzirom na izvanstanične supstrate, proizvode i unutarstanične metabolite. Glavni nedostatak ovih modela je ograničena mogućnost predviđanja razvoja događaja zbog nedostatka informacija o regulaciji metabolizma.

Kao što je već navedeno, primjenom sadašnjeg znanja u području regulacije metabolizma praktički je nemoguće imati sve podatke potrebne za formiranje potpuno razvijenog i egzaktnog kinetičkog modela te se stoga mnogi kinetički i mehanistički modeli razvijaju uz određena pojednostavljenja za uključivanje regulacije metabolizma u model. Dodatni način uključivanja mehanizma regulacije metabolizma u model je primjena načela kibernetičkog modeliranja. Dakle, u kinetičkim modelima, kibernetičke varijable mogu zamijeniti nepoznate mehanističke elemente mehanizma regulacije metabolizma. Takve kibernetičke varijable mogu se primijeniti za opisivanje različitih procesa u stanicama kao što su indukcija, inhibicija, represija ili aktivacija. Kibernetička metodologija pretpostavlja da žive stanice reagiraju na promjene u okolišu na način koji je vođen njihovim prethodnim iskustvima i omogućava najveće šanse za opstanak u datim uvjetima. U tu svrhu, potrebno je

formulirati objektivnu funkciju uz pretpostavku da metabolizam stanice djeluje u skladu s specifičnim fiziološkim ciljem, npr. optimalni rast ili maksimalni prinos produkta. Odnosno, ovakva hipoteza pretpostavlja da stanice reguliraju biosintezu i enzimske aktivnosti s „namjerom“ da optimalno postignu cilj (nutritivni cilj). Jedan od prvih radova koji je opisao biosintezu PHA kibernetičkim modelom objavili su Yoo i Kim (1994). Predložili su da je put biosinteze PHB kontroliran na razini transkripcije na koju utječe vanjski stres, npr. limitacija rasta izvorom dušika. Nedostatak kibernetičkih modela je njihova pretjerana složenost. U određenim situacijama potrebno je postaviti više kibernetičkih ciljeva, te često nije jasno koji je od ovih ciljeva najbitniji i da li je moguć sukob ciljeva, što je također veliki nedostatak ovih modela (Patnaik, 2005).

Kako mehanistički i kibernetički modeli u modeliranju biosinteze PHA imaju određene nedostatke, dio tih nedostaka moguće je otkloniti primjenom neuronskih mreža (Novak i sur., 2015). Neuronske mreže ne zahtijevaju matematički opis sustava. Čest je slučaj da se niti jedna od dizajniranih neuronskih mreža ne može pokazati kao najbolji model. Stoga je korisno razviti hibridne neuronske mreže kombiniranjem neuronke mreže s matematičkim modelima (mehanističkim ili kibernetičkim) (Patnaik, 2005). Zbog znanja kojeg danas posjedujemo, optimiranje ovakvih modela je moguće isključivo pomoću eksperimentalnih podataka. Do danas istraživači nisu pronašli jednostavan generički postupak za osmišljanje preciznog i ciljanog plana za razvoj hibridnih neuronskih mreža. Kao i svi drugi opisani tipovi modela, modeli neuronskih mreža i hibridni modeli smatraju se moćnim alatom u identifikaciji potrebnih postupaka optimizacije procesa (Horvat i sur., 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizmi

U ovom radu korišteni su sojevi bakterija *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50083 i *Pseudomonas citronellolis* DSM 50332. Liofilizirani uzorak oba soja kupljen je od DSMZ (engl. *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*), Njemačka, sojevi su uzgojeni / razmnoženi na Graz University of Technology, Institut of Biotechnology and Biochemical Engineering sukladno uputama dobavljača, a u daljnjem postupku su korišteni kao radne kulture uz redovito precijepljivanje svakih 14 dana na kose agare.

3.1.2. Hranjive podloge

3.1.2.1. Čvrsta podloga za uzgoj inokuluma

Čvrsta podloga za uzgoj inokuluma sadržavala je 5 g L⁻¹ peptona, 3 g L⁻¹ mesnog ekstrakta i 15 g L⁻¹ agara (voda do 1000 ml). Podloga je sterilizirana, razlijana u Petrijeve zdjelice i nakon 24 h spremljena u hladnjak na +4 °C.

3.1.2.2. Uzgoj u reaktorima

Za uzgoj kultura *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332 u reaktorima te biosintezu PHA, korištena je hranjiva podloga sastava koji je naveden u **tablici 3**. Specifično za ove uzgoje jest da je za izvor ugljika korištena smjesa metil estera masnih kiselina srednje dužine lanca (engl. *medium chain lenght fatty acid methyl esters, mcl-FAME*), dobivena pročišćavanjem tijekom proizvodnje biodizela iz masti životinjskog podrijetla.

Tablica 3. Sastav hranjive podloge za rast i nakupljanje PHA granula u bakterijama *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332.

Redni broj	Kemikalija	Koncentracija
1.	Na ₂ HPO ₄	7,17 [g L ⁻¹]
2.	KH ₂ PO ₄	3 [g L ⁻¹]
3.	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2 [g L ⁻¹]
4.	(NH ₄) ₂ SO ₄	1 [g L ⁻¹]
5.	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,02 [g L ⁻¹]
6.	NH ₄ Fe(III)citrat	0,05 [g L ⁻¹]
7.	SL6	1 [mL L ⁻¹]
8.	FAME	5 – 10 [g L ⁻¹]
9.	NH ₄ OH, 25%	Automatsko dodavanje za korekciju pH (služi ujedino kao izvor dušika u fazi uzgoja biomase)
10.	NaOH	Automatsko dodavanje za korekciju pH (provodi se u fazi sinteze PHA bez rast abiomase)

Legenda: SL6 (Otopina elemanata u tragovima): ZnSO₄*7H₂O, 100 mg L⁻¹; H₃BO₃, 300 mg L⁻¹; CoCl₂*6H₂O, 200 mg L⁻¹; CuSO₄, 6 mg L⁻¹; NiCl₂*6H₂O, 20 mg L⁻¹; Na₂MoO₄*2H₂O, 30 mg L⁻¹; MnCl₂*2H₂O, 25 mg L⁻¹.

3.1.3. Izvor ugljika (FAME)

Biodizel životinjskog podrijetla proizvela je tvrtka ARGENT Energy Ltd, UK. FAME su bili pročišćeni destilacijom pri sniženom tlaku (0,95 mbar) i pri temperaturi od 140 – 150 °C. Pročišćavanje FAME je provedeno na Institute of Chemistry, Karl-Franzens-University Graz.

3.2.METODE

3.2.1. Uzgoj inokuluma

Uzgoj inokuluma proveden je na Graz University of Technology, Institut of Biotechnology and Biochemical Engineering, pod mentorstvom prof.dr.sc. Martina Kollera (Muhr i sur., 2013a; Muhr i sur., 2013b).

3.2.1.1.Uzgoj inokuluma *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332

Uzorak soja prenesen je u Petrijevu zdjelicu s krutim agarom sastava navedenog u poglavlju 3.1.2.1. Inkubacija se odvijala na 30 °C. Nakon proliferacije, stanice su prenesene u tikvicu koja je sadržavala hranjivu podlogu sastava navedenog u **tablici 3**, a kao izvor ugljika korišteni su FAME. Zatim je tikvica stavljena na tresilicu pri temperaturi od 30 °C. Uzgoj je trajao 24 sata, nako nečega je dobivena kultura stanica korištena kao inokulum.

3.2.2. Uzgoj radnih mikroorganizama i biosinteza PHA

Uzgoj radnih mikroorganizama u reaktoru proveden je na Graz University of Technology, Institut of Biotechnology and Biochemical Engineering, pod mentorstvom prof.dr.sc. Martina Kollera (Muhr i sur., 2013a; Muhr i sur., 2013b).

3.2.2.1.Uzgoj *P. chlororaphis* DSM 50083 i biosinteza PHA

Provedena su tri aerobna uzgoja *P. chlororaphis* DSM 50083 u laboratorijskom staklenom bioreaktoru (Labfors 3, Infors, CH), radnog volumena od 2 do 5 L, u kontroliranim uvjetima: pH vrijednost $7,1 \pm 0,1$, temperatura 30 °C i koncentracija otopljenog kisika (pO_2) 40 % zasićenosti u fazi rasta biomase, odnosno 20 % tijekom faze biosinteze PHA. Uzgoj je bio proveden kao šaržni s pritokom supstrata. Tijekom uzgoja je korišteno sredstvo protiv pjenjenja (Glanapon 2000, Bussetti, Austrija) koje je dodavano automatski. FAME su dodavani u pritocima, u tekućem obliku s obzirom na brzinu potrošnje (porast pO_2 vrijednosti indicirao je nestanak izvora C) tako da koncentracija nikad nije prešla 11,3114 g/L. Pošto je FAME hidrofoban supstrat (koji se ne miješa s vodom), dodavan je uz emulgator Grinsted Citrem SP70.

Tijekom prve faze uzgoja, pH je održavan konstantnim uz dodavanje 25 %-tne otopine NH_4OH , čime se i koncentracija NH_4^+ , odnosno izvora dušika, održavala na potrebnoj razini. Kada je dostignuta željena koncentracija biomase, započeta je druga faza uzgoja u kojoj je

otopina NH_4OH zamjenjena s 20 %-tnom otopinom NaOH (kao bi se ostvarili uvjeti limitacije rasta izvorom dušika, odnosno kako bi se zaustavio rast biomase i potakla biosinteza PHA).

Prvi je uzgoj bio proveden u mediju početnog volumena 2 L. Najprije je u sterilni bioreaktor dodana 1 L hranjive podloge (s dvostrukom koncentracijom otopljenih tvari navedenih u **tablici 3**), a nakon toga dodana je 1 L inokuluma. Početna koncentracija FAME iznosila je 5 g L^{-1} . Lag faza rasta trajala je 12 h. Prva faza uzgoja, odnosno faza rasta, trajala je do 27 h uzgoja nakon čega započinje druga faza uzgoja, odnosno faza biosinteze PHA. Uzgoj je prekinut u 49 h.

Drugi je uzgoj proveden u mediju početnog volumena 5 L – najprije je u sterilni bioreaktor dodano 2,5 L hranjive podloge (s dvostrukom koncentracijom otopljenih tvari navedenih u **tablici 3**), nakon čega je dodano 2,5 L inokuluma. Ovog puta je početna koncentracija FAME iznosila 10 g L^{-1} . Lag faza je trajala 5 h, s faza rasta je provedena do 23 h uzgoja. Nakon toga, započeta je faza biosinteze PHA potaknuta limitacijom rasta izvorom dušika. Ovaj uzgoj je trajao 39 h.

Treći je uzgoj proveden u mediju početnog volumena 5 L, uz početnu koncentraciju FAME od 10 g L^{-1} . Bioreaktor je bio inokuliran s volumetrijski umanjenim inokulumom u odnosu na volumen hranjive podloge kako bi se omogućilo mjerenje prilagodbe ovog soja na povećanje volumena. Inokulum je bio uzgojen u hranjivom mediju volumena 1,5 L (sastav prema **tablici 3**). Nakon uzgoja je biomasa centrifugirana (20 min na 4°C i 5000 o min^{-1}) i stanice su resuspendirane u 1 L hranjive podloge. Ovaj inokulum je zatim dodan u bioreaktor koji je već sadržavao 4 L hranjive podloge. Prva faza uzgoja biomase trajala je 24 h, nakon čega je slijedila faza biosinteze PHA. Uzgoj je trajao 46 h.

3.2.2.2. Uzgoj *P. citronellolis* DSM 50332 i biosinteza PHA

Provedena su dva aerobna uzgoja *P. citronellolis* DSM 50332 u laboratorijskom staklenom bioreктору (Labfors 3, Infors, CH), radnog volumena od 2 do 5 L, u kontroliranim uvjetima: pH vrijednost $7,1 \pm 0,1$, temperatura 30°C i koncentracija otopljenog kisika (pO_2) 40 % zasićenosti u fazi rasta biomase, odnosno 20 % tijekom faze biosinteze PHA. Uzgoj je bio proveden kao šaržni s pritokom supstrata uz dodatak sredstva protiv pjenjenja (Glanapon 2000, Bussetti, Austrija) i emulgator Grinsted Citrem SP70. FAME su dodavani u pritocima na način opisan u poglavlju 3.2.2.1.

Tijekom prve faze uzgoja, pH je održavan konstantnim uz dodavanje 25 %-tne otopine NH_4OH , čime se regulirala i koncentracija NH_4^+ (izvora dušika). Kada je dostignuta željena

koncentracija biomase započeta je druga faza uzgoja – otopina NH_4OH zamjenjena je s 20 %-tnom otopinom NaOH , kao bi se ostvarili uvjeti limitacije rasta izvorom dušika, odnosno kako bi se zaustavio rast biomase i potakla biosinteza PHA.

Prvi uzgoj proveden je u mediju početnog volumena 5 L. Najprije je u sterilni bioreaktor dodano 2,5 L hranjive podloge (s dvostrukom koncentracijom otopljenih tvari navedenih u **tablici 3**), nakon čega je dodano 2,5 L inokuluma. Početna koncentracija FAME iznosila je 5 g L^{-1} . Lag faza rasta trajala je 12 h. Faza rasta mikroorganizma trajala je do 33 h uzgoja. Ovaj uzgoj je prekinut u 72 h.

Drugi uzgoj započet je u mediju volumena 5 L, koji je načinjen na isti način kao i kod prvog uzgoja. Početna koncentracija FAME je iznosila $7,5 \text{ g L}^{-1}$. Lag faza je trajala 15 h te je faza rasta provedena do 19 h uzgoja, nakon čega započinje faza biosinteze PHA. Uzgoj je trajao 45 h.

3.2.3. Analitičke metode

Analitičko praćenje procesa (izuzevši analizu FAME i *scl*-PHA) za pokuse opisane u poglavljima 3.2.2.1 i 3.2.2.2 izvršeno je na Graz University of Technology, Institut of Biotechnology and Biochemical Engineering (Muhr i sur., 2013a; Muhr i sur., 2013b), odnosno analiza sastava *scl*-PHA i FAME provedena je na Institute of Chemistry, Karl-Franzens-University Graz.

3.2.3.1. Analiza sastava FAME

Sastav FAME bio je određen plinskom kromatografijom na uređaju HP 7890 GC opremljenom s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) prema standardnoj proceduri. Kromatografsko razdvajanje pojedinih metil estera masnih kiselina provedeno je na DB koloni ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,15 \mu\text{m}$). Kao plin nosioc korišten je helij ($0,7 \text{ mL min}^{-1}$). Volumen injektiranog uzorka iznosio je $1 \mu\text{L}$. Identifikacija pikova je provedena usporedbom retencijskog vremena sa retencijskim vremenima standarada (GLC-462, Nu Check Prep Inc).

3.2.3.2. Određivanje koncentracije suhe tvari biomase

Za određivanje koncentracije suhe tvari biomase biomase (eng. *cell dry mass*, CDM) primjenjena je gravimetrijska metoda. 5 mL uzorka je centrifugirano u prethodno izvaganoj staklenoj kiveti na vrijeme od 10 min, temperaturi od 10°C i pri 4000 *ref* u hladenoj centrifugi Heraeus Megafuge 1.0 R. Nakon centrifugiranja, oddekaniran je supernatant i

korišten za određivanje koncentracije supstrata (C- i N- izvora). Stanice su zatim bile isprane otopinom etanola i vode (1:1), ponovno centrifugirane, zaleđene i liofilizirane do konstantne mase. CDM je bila određena kao razlika između mase kivete koja je sadržavala nativnu biomasu i mase prazne kivete. Određivanje je vršeno u dvije paralele. Liofilizirane stanice su zatim korištene za određivanje sadržaja unutarstaničnog *mcl*-PHA.

3.2.3.3. Određivanje optičke gustoće

Za mjerenje rasta bakterija, uzorak je bio razrijeđen po potrebi i mjerena je optička gustoća na valnoj duljini od 420 nm. Kao slijepa proba korištena je deionizirana voda. Mjerenje je provedeno na Genesys 10S spektrofotometru (Thermo Scientific, USA).

3.2.3.4. Brzi test koncentracije amonijaka

Za brzo određivanje koncentracije amonijaka primijenjen je vizualni semikvantitativni test (Merckoquant 110024, Merck Millipore, Njemačka). Nakon centrifugiranja opisanog u prethodnom poglavlju, 1 mL supernatanta pomiješan je s 2 kapi reagensa NH_4 -1. Zatim je u uzorak uronjena testna traka na 3 sekunde. Nakon 10 sekundi dio trake koji je bio uronjen u uzorak uspoređen je sa skalom referentnih boja.

3.2.3.5. Precizno određivanje koncentracije amonijaka

Za precizno određivanje koncentracije amonijaka u podlozi primijenjen je komercijalno dostupan test (Merck, Spectroquant, 1.00683.0001) koji se temelji na reakciji amonijaka s hipokloritnim ionima čime se dobija monokloramin koji dalje reagira s fenolom (formira plavi indofenol derivat). Ovaj se spoj može odrediti fotometrijski pri valnoj duljini od 690 nm. Mjerno područje ovog testa za amonijak je od 6 – 193 mg L⁻¹. Kao slijepa proba korišten je amonijev sulfat.

Nakon centrifugiranja uzorka opisanog u poglavlju 3.2.3.2. supernatanti paralela su bili združeni i alikvot je odfiltriran za određivanje amonijaka. Najprije je 5 mL NH_4 -1 reagensa pomiješano s 0,1 mL uzorka. Nakon toga, dodan je reagens NH_4 -2 i otopina se miješala sve dok se reagens nije potpuno otopio. Otopina je zatim ostavljena 15 min kako bi se odvila reakcija, te je nakon toga mjerena apsorbancija na valnoj duljini od 690 nm. Kao slijepa proba korištena je deionizirana voda.

3.2.3.6. Izolacija *mcl*-PHA iz biomase

Najprije je provedeno odmašćivanje biomase prekonoćnom ekstrakcijom na sobnoj temperaturi s etanolom čija je koncentracija bila 20 puta veća od koncentracije biomase, uz kontinuirano miješanje. Zatim je biomasa filtrirana i ostatak etanola je uklonjen sušenjem u struji zraka. *mcl*-PHA je izoliran iz odmašćene biomase prekonoćnom Soxleth ekstrakcijom s kloroformom. Volumen ove otopine je smanjen uklanjanjem većeg dijela kloroforma u rotacionom uparivaču. Nakon toga je sušenjem zrakom uklonjen sav kloroform i dobiven je *mcl*-PHA u obliku blago smeđe smole.

3.2.3.7. Određivanje proteina

Zbog velike količine izvanstaničnog materijala, topivog u etanolu, kojeg proizvode ovi sojevi, provedeno je određivanje proteina u konačnim uzorcima uzgoja. Suspenzija stanica je stoga bila propuštena četiri puta kroz Francusku prešu pri tlaku od 100 bara. Nakon toga, je primijenjen komercijalno dostupan Protein Quantification Assay (Macherey-Nagel, Njemačka) kako bi se odredio sadržaj proteina u suspenziji. Određena je apsorbancija na valnoj duljini od 570 nm primjenom Genesys 10S UV-VIS spektrofotometra (Thermo Scientific, USA).

3.2.3.8. GC-FID analiza PHA

PHA u uzorcima liofilizirane biomase bili su hidrolizirani i transesterificirani kiselinskom metanolizom. Plinska kromatografija je bila provedena na uređaju 6850 Network GC System (Agilent Technologies) opremljenom s HP5 kapilarnom kolonom (25 m * 0,32 mm * 0,52 μ m) i plameno-ionizacijskim detektorom (engl. *flame ionization detector*, FID). Kao plin nosioc korišten je helij (*Linde*; čistoća = 4,6) s omjerom razdvajanja 1:5, kao plinovi za detekciju korišteni su vodik (*Linde*; čistoća = 5,0) i sintetički zrak (*Linde*; čistoća = 5,0), a kao pomoćni plin korišten je dušik (*Linde*; čistoća = 5,0).

Uporabljena su dva različita temperaturna programa po uzorku kako bi se odredili *mcl*-PHA monomeri kao i mogući *scl*-PHA monomeri. Za određivanje mogućih *scl*-PHA monomera primijenjen je protokol prikazan u **tablici 4**.

Tablica 4. Protokol plinske kromatografije primijenjen za određivanje *scl*-PHA monomera.

Početna temperatura: 50 °C		
Gradijent zagrijavanja 1: 15 °C min ⁻¹	Gradijent zagrijavanja 2: 2 °C min ⁻¹	-
Konačna temp. 1: 60 °C	Konačna temp. 2: 80 °C	Konačna temp. 3: 300 °C
-	-	Konačno vrijeme 3: 5 min

U **tablici 5** prikazan je protokol primijenjen za određivanje *mcl*-PHA monomera.

Tablica 5. Protokol plinske kromatografije primijenjen za određivanje *mcl*-PHA monomera

Početna temperatura: 50 °C		
Gradijent zagrijavanja 1: 15 °C min ⁻¹	Gradijent zagrijavanja 2: 2 °C min ⁻¹	-
Konačna temp. 1: 200 °C	Konačna temp. 2: 240 °C	Konačna temp. 3: 300 °C
Konačno vrijeme: 10 min	Konačno vrijeme: 4 min	Konačno vrijeme 3: 5 min

Određivanje je provedeno u dvije paralele. Metil esteri PHA monomera detektirani su FID detektorom. Volumen injektiranja uzorka bio je 2 µL.

Kao standardi korišteni su *mcl*-PHA koji sadržavaju 3-hidroksiheksanoat (HHX, C₆), 3-hidroksioktanoat (HO, C₈), 3- hidroksidekanoat (HD, C₁₀), 3-hidroksidodekanoat (HDD, C₁₂) (Metabolix Inc., USA), 3-hidroksiheptanoat (HHp, C₇) i 3-hidroksinonenoat (HN, C₉) (VersamerTM, Polyferm, Kanada). Nadalje, biopolimeri poli(3HB-*ko*-15,6%-3HV) (BIOPOLTM, ICI, UK) i poli(3HB-*ko*-11,2%-4HB) (GreenBioTM, Tianjin Green Bioscience & DSM, Kina) su korišteni kao standardi za određivanje *scl*-PHA; kao interni standard korištena je heksanska kiselina. Koncentracija *mcl*-PHA je definirana kao suma koncentracija svih identificiranih monomera. Udio *mcl*-PHA u biomasi je bio definiran kao omjer mase *mcl*-PHA i ukupne mase suhe tvari stanica (CDM). Rezidualna biomasa je izražena kao razlika u koncentraciji ukupne suhe tvari stanica i *mcl*-PHA.

3.3.MATEMATIČKO MODELIRANJE

3.3.1. Računalni program „Berkeley Madonna“ i korištene programske funkcije

Za izradu matematičkih modela, programiranje i matematičke simulacije korišten je računalni program „Berkeley Madonna“ verzija 8.3.21. Taj program numerički rješava diferencijalne jednačbe i sustave običnih diferencijalnih jednačbi (Macey i Oster, 2016).

U numeričkom rješavanju sustava diferencijalnih jednačbi matematičkih modela korištena je metoda Runge-Kutta četvrtog stupnja (RK4) s promjenjivim korakom integracije. Zahtijeva 4 procijene po koraku integracije, ali daje veću stabilnost rješenja od drugih integracijskih metoda koje zahtijevaju manje procjena po koraku (Burden i Faires, 2011).

Za optimizaciju vrijednosti parametara matematičkih jednačbi (modela) korištene su programske funkcije: „multiple curve fit“ (optimiranje višestrukih funkcija“) i „define sliders“ (uspostava grafičkog klizača).

3.3.2. Jednačbe primjenjene u matematičkom modelu biosinteze PHA

3.3.2.1. Jednačbe primjenjene u matematičkom modelu biosinteze PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083

Masa ukupne suhe tvari biomase ($m(CDM)$):

$$m(CDM) = m(X_r) + m(PHA) \quad [1]$$

gdje je $m(X_r)$ masa rezidualne biomase, a $m(PHA)$ masa PHA.

Koncentracija suhe tvari biomase (CDM):

$$CDM = \frac{m(CDM)}{V} \quad [2]$$

gdje je V volumen podloge

Specifična brzina rasta (μ):

$$\mu = \mu_{max} * \frac{FAME}{K_{fame} + FAME} * \frac{NH_4}{K_N + NH_4} \quad [3]$$

gdje je μ_{max} maksimalna specifična brzina rasta, $FAME$ koncentracija izvora C (FAME) u podlozi, K_{fame} Monod-ova konstanta za FAME, NH_4 koncentracija amonijaka u podlozi, K_N Monod-ova konstanta za amonijak

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu rezidualne biomase:

$$\frac{dm(X_r)}{dt} = \mu * m(X_r) - \sum \text{uzorkovanje} \quad [4]$$

Koncentracija rezidualne biomase (X_r):

$$X_r = \frac{m(X_r)}{V} \quad [5]$$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu masa PHA:

$$\frac{dm(PHA)}{dt} = q * m(X_r) + \mu * Y_{PHA/X_r} * m(X_r) - \sum \text{uzorkovanje} \quad [6]$$

gdje je q specifična brzina biosinteze PHA, a Y_{PHA/X_r} koeficijent prinosa PHA po X_r .

Specifična brzina biosinteze PHA (q):

$$q = q_{max} * \frac{FAME}{K_{fame} + FAME} * \frac{K_{iNH_4}}{K_{iNH_4} + NH_4} \quad [7]$$

gdje je q_{max} maksimalna specifična brzina biosinteze PHA, a K_{iNH_4} konstanta inhibicije biosinteze PHA amonijakom.

Koncentracija PHA (PHA):

$$PHA = \frac{m(PHA)}{V} \quad [8]$$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu masa amonijaka:

$$\frac{dm(NH_4)}{dt} = -\frac{\mu * m(X_r)}{Y_{X_r/NH_4}} + \sum \text{pritok} - \sum \text{uzorkovanje} \quad [9]$$

gdje je $m(NH_4)$ masa amonijaka, a Y_{X_r/NH_4} koeficijent prinosa rezidualne biomase po amonijaku.

Koncentracija amonijaka (NH_4):

$$NH_4 = \frac{m(NH_4)}{V} \quad [10]$$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu masa izvora C (FAME):

$$\frac{dm(FAME)}{dt} = -\frac{q * m(X_r)}{Y_{PHA/FAME}} - \frac{\mu * m(X_r)}{Y_{X_r/FAME}} + \sum \text{pritok} - \sum \text{uzorkovanje} \quad [11]$$

gdje je $m(FAME)$ masa FAME, $Y_{PHA/FAME}$ koeficijent prinosa PHA po FAME, $Y_{X_r/FAME}$ koeficijent prinosa rezidualne biomase po FAME.

Koncentracija izvora C (FAME):

$$FAME = \frac{m(FAME)}{V} \quad [12]$$

Diferencijalna jednačba za promjenu volumena podloge u reaktoru:

$$\frac{dV}{dt} = \sum \text{pritok } FAME + \sum \text{pritok } NH_4 - \sum \text{uzorkovanje} \quad [13]$$

Koncentracija pojedinih monomera uklopljenih u *mcl*-PHA (C₆ – C₁₂ frakcije) (C_i):

$$C_i = PHA * F_{C_i} \quad [14]$$

gdje je F_{C_i} udio određenog monomera u strukturi *mcl*-PHA

3.3.2.2. Jednačbe primjenjene u matematičkom modelu biosinteze PHA u stanicama *P. citronellolis* DSM 50332

Masa ukupne suhe tvari biomase:

$$m(CDM) = m(X_r) + m(PHA) \quad [1]$$

Koncentracija suhe tvari biomase:

$$CDM = \frac{m(CDM)}{V} \quad [2]$$

Specifična brzina rasta:

$$\mu = \mu_{max} * \frac{FAME}{K_{fame} + FAME} * \frac{NH_4}{K_N + NH_4} * \frac{O_2}{K_{O_2} + O_2} \quad [15]$$

gdje je O_2 koncentracija otopljenog kisika u podlozi, a K_{O_2} Monod-ova konstanta za kisik.

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu rezidualne biomase:

$$\frac{dm(X_r)}{dt} = \mu * m(X_r) - \sum \text{uzorkovanje} \quad [4]$$

Koncentracija rezidualne biomase:

$$X_r = \frac{m(X_r)}{V} \quad [5]$$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu masa PHA:

$$\frac{dm(PHA)}{dt} = q * m(X_r) + \mu * Y_{PHA/X_r} * m(X_r) - \sum \text{uzorkovanje} \quad [6]$$

Specifična brzina biosinteze PHA:

$$q = q_{max} * \frac{FAME}{K_{fame} + FAME} * \frac{K_{iNH_4}}{K_{iNH_4} + NH_4} \quad [7]$$

Koncentracija PHA:

$$PHA = \frac{m(PHA)}{V} \quad [8]$$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu masa amonijaka:

$$\frac{dm(NH_4)}{dt} = -\frac{\mu * m(X_r)}{Y_{X_r/NH_4}} + \sum pritok - \sum uzorkovanje \quad [9]$$

Koncentracija amonijaka:

$$NH_4 = \frac{m(NH_4)}{V} \quad [10]$$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu masa izvora C (FAME):

$$\frac{dm(FAME)}{dt} = -\frac{q * m(X_r)}{Y_{PHA/FAME}} - \frac{\mu * m(X_r)}{Y_{X_r/FAME}} + \sum pritok - \sum uzorkovanje \quad [11]$$

Koncentracija izvora C (FAME):

$$FAME = \frac{m(FAME)}{V} \quad [12]$$

Diferencijalna jednačba za promjenu volumena podloge u reaktoru:

$$\frac{dV}{dt} = \sum pritok FAME + \sum pritok NH_4 - \sum uzorkovanje \quad [13]$$

Koncentracija pojedinih monomera uklopljenih u *mcl*-PHA (C₆ – C₁₂ frakcije):

$$C_i = PHA * F_{C_i} \quad [14]$$

Koncentracija kisika u podlozi:

$$O_2 = \sum uvođenje kisika \quad [16]$$

3.3.3. Parametri matematičkih modela biosinteze PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332

Parametri korišteni u svakom od matematičkih modela biosinteze PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332 prikazani su u **tablicama 6 – 10**. Svi parametri određeni su računski iz eksperimentalnih podataka te su dalje po potrebi podešeni pomoću programskih funkcija „define sliders“ i „curve fit“

Tablica 6. Parametri matematičkog modela biosinteze PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 – prvi uzgoj.

Oznaka parametra	Pojašnjenje	Vrijednost	Jedinica
DT	korak integracije	0,02	min
INIT $m(X_r)$	početna masa X_r	2,5843	g L ⁻¹
INIT $m(PHA)$	početna masa PHA	0,2093	g L ⁻¹
INIT $m(NH_4)$	početna masa amonijaka	2,40905	g L ⁻¹
INIT $m(FAME)$	početna masa FAME	10	g L ⁻¹
INIT V	početni volumen	2	L
μ_{max}	maksimalna specifična brzina rasta	0,00412	min ⁻¹
K_{fame}	Monod-ova konstanta za FAME	3,953	g L ⁻¹
K_N	Monod-ova konstanta za amonijak	0,009	g L ⁻¹
q_{max}	maksimalna specifična brzina biosinteze PHA	$6,232 \cdot 10^{-4}$	g g ⁻¹ min ⁻¹
K_{iNH_4}	konstanta inhibicije biosinteze PHA amonijakom	19,94	g L ⁻¹
$Y_{Xr/FAME}$	koeficijent prinosa X_r po FAME	1,141	g g ⁻¹
$Y_{PHA/Xr}$	koeficijent prinosa PHA po X_r	0,01	g g ⁻¹
$Y_{PHA/FAME}$	koeficijent prinosa PHA po FAME	0,169	g g ⁻¹
Y_{Xr/NH_4}	koeficijent prinosa X_r po NH_4	4,77	g g ⁻¹
F_{C6}	udio 3-hidroksiheksanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,147	g g ⁻¹
F_{C7}	udio 3-hidroksiheptanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,0116	g g ⁻¹
F_{C8}	udio 3-hidroksioktanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,484	g g ⁻¹
F_{C9}	udio 3-hidroksinonenoata u <i>mcl</i> -PHA	0,0177	g g ⁻¹
F_{C10}	udio 3-hidroksidekanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,2475	g g ⁻¹
F_{C12}	udio 3-hidroksidodekanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,0479	g g ⁻¹

Tablica 7. Parametri matematičkog modela biosinteze PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 – drugi uzgoj.

Oznaka parametra	Pojašnjenje	Vrijednost	Jedinica
DT	korak integracije	0,02	min
INIT $m(X_r)$	početna masa X_r	13,6655	g L ⁻¹
INIT $m(PHA)$	početna masa PHA	2,385	g L ⁻¹
INIT $m(NH_4)$	početna masa amonijaka	3,33	g L ⁻¹
INIT $m(FAME)$	početna masa FAME	50	g L ⁻¹
INIT V	početni volumen	5	L
μ_{max}	maksimalna specifična brzina rasta	0,005	min ⁻¹
K_{fame}	Monod-ova konstanta za FAME	13,6	g L ⁻¹
K_N	Monod-ova konstanta za amonijak	0,1	g L ⁻¹
q_{max}	maksimalna specifična brzina biosinteze PHA	1,959*10 ⁻⁴	g g ⁻¹ min ⁻¹
K_{iNH_4}	konstanta inhibicije biosinteze PHA amonijakom	0,2474	g L ⁻¹
$Y_{Xr/FAME}$	koeficijent prinosa X_r po FAME	1,9998	g g ⁻¹
$Y_{PHA/Xr}$	koeficijent prinosa PHA po X_r	0,028	g g ⁻¹
$Y_{PHA/FAME}$	koeficijent prinosa PHA po FAME	0,08434	g g ⁻¹
Y_{Xr/NH_4}	koeficijent prinosa X_r po NH_4	5,2034	g g ⁻¹
F_{C6}	udio 3-hidroksiheksanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,129	g g ⁻¹
F_{C7}	udio 3-hidroksiheptanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,02073	g g ⁻¹
F_{C8}	udio 3-hidroksioktanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,425	g g ⁻¹
F_{C9}	udio 3-hidroksinonenoata u <i>mcl</i> -PHA	0,055	g g ⁻¹
F_{C10}	udio 3-hidroksidekanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,2631	g g ⁻¹
F_{C12}	udio 3-hidroksidodekanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,0636	g g ⁻¹

Tablica 8. Parametri matematičkog modela biosinteze PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 – treći uzgoj.

Oznaka parametra	Pojašnjenje	Vrijednost	Jedinica
DT	korak integracije	0,02	min
INIT $m(X_r)$	početna masa X_r	3,877	g L ⁻¹
INIT $m(PHA)$	početna masa PHA	0,523	g L ⁻¹
INIT $m(NH_4)$	početna masa amonijaka	2,16	g L ⁻¹
INIT $m(FAME)$	početna masa FAME	50	g L ⁻¹
INIT V	početni volumen	5	L
μ_{max}	maksimalna specifična brzina rasta	0,003407	min ⁻¹
K_{fame}	Monod-ova konstanta za FAME	0,1	g L ⁻¹
K_N	Monod-ova konstanta za amonijak	0,05904	g L ⁻¹
q_{max}	maksimalna specifična brzina biosinteze PHA	$0,924 \cdot 10^{-4}$	g g ⁻¹ min ⁻¹
K_{iNH_4}	konstanta inhibicije biosinteze PHA amonijakom	0,12	g L ⁻¹
$Y_{Xr/FAME}$	koeficijent prinosa X_r po FAME	1,15	g g ⁻¹
$Y_{PHA/Xr}$	koeficijent prinosa PHA po X_r	0,0367	g g ⁻¹
$Y_{PHA/FAME}$	koeficijent prinosa PHA po FAME	0,2034	g g ⁻¹
Y_{Xr/NH_4}	koeficijent prinosa X_r po NH_4	7,2	g g ⁻¹
F_{C6}	udio 3-hidroksiheksanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,09016	g g ⁻¹
F_{C7}	udio 3-hidroksiheptanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,0174	g g ⁻¹
F_{C8}	udio 3-hidroksioktanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,425	g g ⁻¹
F_{C9}	udio 3-hidroksinonenoata u <i>mcl</i> -PHA	0,0283	g g ⁻¹
F_{C10}	udio 3-hidroksidekanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,291	g g ⁻¹
F_{C12}	udio 3-hidroksidodekanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,058	g g ⁻¹

Tablica 9. Parametri matematičkog modela biosinteze PHA u stanicama *P. citronellolis* DSM 50332 – prvi uzgoj.

Oznaka parametra	Pojašnjenje	Vrijednost	Jedinica
DT	korak integracije	0,2	min
INIT $m(X_r)$	početna masa X_r	6,2645	g L ⁻¹
INIT $m(PHA)$	početna masa PHA	1,2855	g L ⁻¹
INIT $m(NH_4)$	početna masa amonijaka	1,98158	g L ⁻¹
INIT $m(FAME)$	početna masa FAME	25	g L ⁻¹
INIT V	početni volumen	5	L
μ_{max}	maksimalna specifična brzina rasta	0,0037	min ⁻¹
K_{fame}	Monod-ova konstanta za FAME	1,18	g L ⁻¹
K_N	Monod-ova konstanta za amonijak	0,05904	g L ⁻¹
q_{max}	maksimalna specifična brzina biosinteze PHA	$0,5077 \cdot 10^{-4}$	g g ⁻¹ min ⁻¹
K_{iNH_4}	konstanta inhibicije biosinteze PHA amonijakom	$1 \cdot 10^{-6}$	g L ⁻¹
K_{O_2}	Monod-ova konstanta za kisik	0,0017	g L ⁻¹
$Y_{Xr/FAME}$	koeficijent prinosa X_r po FAME	1,14	g g ⁻¹
$Y_{PHA/Xr}$	koeficijent prinosa PHA po X_r	0,018	g g ⁻¹
$Y_{PHA/FAME}$	koeficijent prinosa PHA po FAME	0,0868	g g ⁻¹
Y_{Xr/NH_4}	koeficijent prinosa X_r po NH_4	5,5	g g ⁻¹
F_{C6}	udio 3-hidroksiheksanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,05559	g g ⁻¹
F_{C7}	udio 3-hidroksiheptanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,0194	g g ⁻¹
F_{C8}	udio 3-hidroksioktanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,3945	g g ⁻¹
F_{C9}	udio 3-hidroksinonenoata u <i>mcl</i> -PHA	0,058	g g ⁻¹
F_{C10}	udio 3-hidroksidekanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,3926	g g ⁻¹
F_{C12}	udio 3-hidroksidodekanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,08717	g g ⁻¹

Tablica 10. Parametri matematičkog modela biosinteze PHA u stanicama *P. citronellolis* DSM 50332 – drugi uzgoj.

Oznaka parametra	Pojašnjenje	Vrijednost	Jedinica
DT	korak integracije	0,2	min
INIT $m(X_r)$	početna masa X_r	15,8935	g L ⁻¹
INIT $m(PHA)$	početna masa PHA	2,2	g L ⁻¹
INIT $m(NH_4)$	početna masa amonijaka	2,09	g L ⁻¹
INIT $m(FAME)$	početna masa FAME	37,5	g L ⁻¹
INIT V	početni volumen	5	L
μ_{max}	maksimalna specifična brzina rasta	0,003	min ⁻¹
K_{fame}	Monod-ova konstanta za FAME	1,18	g L ⁻¹
K_N	Monod-ova konstanta za amonijak	0,05904	g L ⁻¹
q_{max}	maksimalna specifična brzina biosinteze PHA	1*10 ⁻⁴	g g ⁻¹ min ⁻¹
K_{iNH4}	konstanta inhibicije biosinteze PHA amonijakom	0,030001	g L ⁻¹
K_{O2}	Monod-ova konstanta za kisik	0,0017	g L ⁻¹
$Y_{Xr/FAME}$	koeficijent prinosa X_r po FAME	1,14	g g ⁻¹
$Y_{PHA/Xr}$	koeficijent prinosa PHA po X_r	0,009	g g ⁻¹
$Y_{PHA/FAME}$	koeficijent prinosa PHA po FAME	0,0868	g g ⁻¹
$Y_{Xr/NH4}$	koeficijent prinosa X_r po NH_4	5,5	g g ⁻¹
F_{C6}	udio 3-hidroksiheksanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,0635	g g ⁻¹
F_{C7}	udio 3-hidroksiheptanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,0178	g g ⁻¹
F_{C8}	udio 3-hidroksioktanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,423	g g ⁻¹
F_{C9}	udio 3-hidroksinonenoata u <i>mcl</i> -PHA	0,0276	g g ⁻¹
F_{C10}	udio 3-hidroksidekanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,343	g g ⁻¹
F_{C12}	udio 3-hidroksidodekanoata u <i>mcl</i> -PHA	0,0697	g g ⁻¹

3.3.4. Testiranje osjetljivosti matematičkih modela biosinteze PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332 na parametre

Kinetički parametri matematičkih modela μ_{max} , K_{fame} , q_{max} i K_N (referentne vrijednosti) navedeni u poglavlju 3.3.2. promijenjeni su jedan po jedan za $\pm 10\%$ i $\pm 20\%$. Za svaku promjenu parametara matematičkog modela izvršila se simulacija biološkog procesa. Kao kriterij koji pokazuje veličinu odstupanja matematičkog modela nakon promjene vrijednosti parametra od rezultata dobivenih uz referentne vrijednosti istog parametara, korištena je jednačba [17]: suma razlike kvadrata odstupanja vrijednosti funkcije dobivene referentnim parametrom od vrijednosti funkcije dobivene promijenjenim parametrom (G):

$$G = \sum (C_{mod} - C_{exp})^2 \quad [17]$$

gdje je C_{mod} vrijednost funkcije dobivene primijenom referentnog parametra, a C_{exp} vrijednost funkcije dobivene promijenjenim parametrom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kao što je već spomenuto *mcl*-PHA su predloženi kao alternativa petrokemijskoj plastici. Unatoč mnogim istraživanjima posvećenim biopolimerima, PHA još uvijek nisu uistinu konkurentni petrokemijskoj plastici, uglavnom zbog visokih troškova proizvodnje, ali u manjoj mjeri i zbog svojstava materijala. Veliki dio troškova u biotehnološkoj proizvodnji PHA odnosi se upravo na izvor ugljika. Dakle, korištenje jeftinih izvora ugljika dostupnih u velikim količinama je prvi preduvjet da bi proizvodnja PHA bila ekonomski konkurentna (Koller i sur., 2012). To je i razlog zbog kojeg su kao izvor ugljika istraživani i korišteni sporedni proizvodi – zapravo otpadni materijali iz proizvodnje biodizela: zasićeni metil esteri masnih kiselina (FAME) visokog tališta proizvedeni iz lipida životinjskog podrijetla (Muhr i sur., 2013a; Muhr i sur., 2013b). U Europi klaonice i prehrambena industrija svake godine proizvedu 500 000 t lipida životinjskog podrijetla. Ukoliko se ovaj otpad uporabi za proizvodnju biodizela, procjenjuje se da bi se svake godine moglo proizvesti 50 000 t FAME koji pretežito sadržavaju estere zasićenih masnih kiselina visokog tališta. Takvi FAME u zimskom razdoblju pogoršavaju svojstva biodizela kao goriva te se stoga moraju izdvojiti i onda iskoristiti u proizvodnji PHA (dok se zaostala frakcija FAME niskog tališta može koristiti kao biogorivo 2. generacije) (Muhr i sur., 2013b). Sun i sur. (2007) procjenjuju da bi cijena proizvodnje *mcl*-PHA na industrijskoj razini primjenom oktana kao jeftinog izvora ugljika iznosila 5 – 10 \$ po kilogramu. Osim uporabom jeftinih izvora ugljika, troškovi proizvodnje mogu se smanjiti i optimiranjem izolacije i pročišćavanja PHA iz stanica proizvođača. Također, mogu se smanjiti i optimiranjem samog procesa proizvodnje PHA (Koller i sur., 2012). Kao koristan alat u optimiranju procesa i kontroli mikrobiološke proizvodnje i metabolizma ističe se matematičko modeliranje (Novak i sur., 2015). Zbog složene prirode regulatornog mehanizma u mikrobnj proizvodnji PHA, matematičko modeliranje procesa zasnovano na eksperimentalnim podacima postaje sve interesantnije. Ono omogućava provjeru pretpostavki o funkcioniranju metaboličkih mreža u proizvodnim mikroorganizmima, razumijevanje metabolizma PHA-proizvodnih mikroorganizama i istraživanje kinetičkih pretpostavki sinteze PHA. Osim toga, modeli omogućavaju smanjenje broja potrebnih eksperimenata za razvoj biotehnološkog procesa (Koller i sur., 2012).

Svrha ovog rada bila je izrada matematičkih modela kojima bi se mogla opisati biosinteza *mcl*-PHA u bakterijama *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332. Ovi modeli se dalje mogu koristiti za optimiranje procesa proizvodnje *mcl*-PHA jer smanjuju

broj potrebnih eksperimenata za razvoj procesa te omogućavaju lakšu kontrolu procesa i metabolizma PHA-proizvodnih mikroorganizama. Nadalje, pomoću ovih matematičkih modela moguće je i detektirati mnoge nepravilnosti tijekom provođenja procesa. Ovi modeli su također primijenjeni u svrhu boljeg razumjevanja kinetike rasta PHA-proizvodnih mikroorganizama kao i kinetike sinteze *mcl*-PHA tijekom faze limitacije rasta izvorom dušika. Rezultati ovoga rada predočeni su u obliku dijagrama koji prikazuju slaganje eksperimentalnih i modelom dobivenih vrijednosti pojedinih ključnih bioloških varijabli. Rezultati testiranja osjetljivosti matematičkih modela na promjenu parametara prikazani su kao suma razlike kvadrata odstupanja vrijednosti funkcije dobivene referentnim parametrom i vrijednosti funkcije dobivene promijenjenim parametrom (u ovisnosti o veličini promjene parametara u odnosu na referentni parametar).

4.1. Ključne varijable i kinetičke jednadžbe primijenjene u matematičkom modelu biosinteze PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332

U matematičkom modeliranju biosinteze PHA za uzgoj *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332 primijenjeno je formalno kinetičko modeliranje. Formalno kinetički modeli su se zbog svoje jednostavnosti pokazali vrlo praktičnim za matematičko definiranje vremanskog tijeka različitih mikrobnih procesa (Novak i sur., 2015). Jednostavni modeli nužni su za dobivanje temeljnog znanja za oblikovanje procesa, za ekonomske izračune i kontrolu procesa (Annuaire i sur., 2008).

Matematički modeli primijenjeni u ovom radu su razvijeni na osnovu nekoliko principa:

- a) Primijenjena je strategija dva odjeljka: ukupna masa stanica mikroorganizma je podijeljena na dva dijela, biološki (katalitički) aktivni dio nazvan rezidualna biomasa i na katalitički neaktivnu intracelularnu rezervnu tvar (PHA).
- b) Rezidualna biomasa (katalitički dio biomase) je sintetizirana iz izvora C (FAME) i amonijaka (izvori ostalih biogenih elemenata su zbog svog malog udjela zanemareni); specifična brzina rasta određena je koncentracijom FAME i amonijaka (utjecaj ostalih potencijalnih faktora je isključen jer su bili dodani u podlogu u značajnom suvišku); pad koncentracije amonijaka u podlozi ispod određene granice uzrokuje prekid rasta

rezidualne biomase i inicira povećanje specifične brzine biosinteze *mcl*-PHA iz FAME.

- c) Intracelularni produkt (*mcl*-PHA) sintetiziran je iz FAME kao izvora C; biosinteza *mcl*-PHA se odvija smanjenom brzinom tijekom eksponencijalne faze rasta biomase te intenzivno tijekom faze limitacije rasta biomase izvorom dušika; visoka koncentracija izvora dušika u početku uzgoja modelirana je u svojstvu inhibitora biosinteze *mcl*-PHA tijekom faze rasta biomase.
- d) Prethodno provedena kinetička analiza uporabljena je za određivanje eksperimentalnih vrijednosti osnovnih parametara modela.

Strategija „dva odjeljka“ (engl. *two main biomass compartments*) prikazana je na **slici 4**; masa ukupne suhe tvari biomase određena eksperimentalno (CDM) definirana je kao zbroj mase rezidualne biomase (biološki aktivnog, katalitičkog dijela stanice) i mase PHA (nekatalitičkog dijela) (Heinzle i Lafferty, 1980):

$$m(CDM) = m(X_r) + m(PHA) \quad [1]$$



Slika 4. Strategija „dva odjeljka“. Bijeli krug simbolizira PHA (nekatalitički odjeljak), plava površina simbolizira ostali (biološki, katalitički aktivni) dio stanice tzv. rezidualnu biomasu.

Specifična brzina rasta *P. chlororaphis* DSM 50083 je definirana dvosupstratnom Monod-ovom jednačbom (McGee i sur., 1972) pošto je rast *P. chlororaphis* u uzgojima ograničavan koncentracijom dva različita supstrata, FAME i NH_4^+ :

$$\mu = \mu_{max} * \frac{FAME}{K_{fame} + FAME} * \frac{NH_4}{K_N + NH_4} \quad [3]$$

Specifična brzina rasta za *P. citronellolis* DSM 50332 definirana je trosupstratnom Monod-ovom jednačbom prema McGee i sur. (1972) jer je ovaj soj pokazao znatnu ovisnost brzine rasta o koncentraciji otopljenog kisika u podlozi:

$$\mu = \mu_{max} * \frac{FAME}{K_{fame} + FAME} * \frac{NH_4}{K_N + NH_4} * \frac{O_2}{K_{O_2} + O_2} \quad [15]$$

Promjena mase rezidualne biomase u vremenu je za oba soja određena diferencijalnom jednačbom prema Monodovom izrazu (Monod, 1942):

$$\frac{dm(X_r)}{dt} = \mu * m(X_r) - \sum \text{uzorkovanje} \quad [4]$$

P. chlororaphis i *P. citronellolis* pripadaju skupini PHA-proizvodnih mikroorganizama kod kojih je biosinteza PHA djelomično vezana uz rast, a intenzivna biosinteza jest odijeljena od faze rasta, pa je brzina biosinteze PHA mogla biti definirana Luedeking-Piret jednadžbom (Luedeking i Piret, 1959):

$$\frac{dm(PHA)}{dt} = q * m(X_r) + \mu * Y_{PHA/X_r} * m(X_r) - \sum \text{uzorkovanje} \quad [6]$$

Nadalje, intenzivna biosinteza PHA u uvjetima ograničenja rasta nedostatkom izvora N, a u suvišku izvora C, matematički je riješena primjenom inhibicije sinteze PHA izvorom dušika, odnosno amonijakom, pa je izraz za specifičnu brzinu biosinteze PHA formiran kao Monodova jednadžba uz ugrađenu inhibiciju amonijakom:

$$q = q_{max} * \frac{FAME}{K_{fame} + FAME} * \frac{K_{iNH_4}}{K_{iNH_4} + NH_4} \quad [7]$$

Pretpostavljeno je da se esteri metanola i viših masnih kiselina FAME za oba mikroorganizma troše na rast rezidualne biomase i biosintezu PHA pa je stoga izraz za brzinu potrošnje FAME definiran na sljedeći način:

$$\frac{dm(FAME)}{dt} = -\frac{q * m(X_r)}{Y_{PHA/FAME}} - \frac{\mu * m(X_r)}{Y_{X_r/FAME}} + \sum \text{pritok} - \sum \text{uzorkovanje} \quad [11]$$

Amonijak se troši samo na rast biomase te se dobavlja u svrhu kontrole pH u prvoj fazi uzgoja, pa je potrošnja amonijaka definirana sljedećim izrazom:

$$\frac{dm(NH_4)}{dt} = -\frac{\mu * m(X_r)}{Y_{X_r/NH_4}} + \sum \text{pritok} - \sum \text{uzorkovanje} \quad [9]$$

U jednadžbama promjene mase rezidualne biomase u vremenu (4), mase PHA u vremenu (6), mase FAME u vremenu (11) i mase amonijaka u vremenu (9) u obzir je uzeto i izuzimanje uzoraka iz bioreaktora (uzorkovanje). Izuzimanje uzorka definirano je kao kratkotrajna promjena volumena pomoću funkcije „kvadratnog pulsa“ (engl. *squarepulse*) definirane visine i određenog trajanja. U obzir je uzet i pritok amonijaka i FAME na isti način kao i uzorkovanje ali suprotnog predznaka.

Pošto je uzgoj vršen kao šaržni s pritokom supstrata, u modelu se u obzir uzela i promjena volumena u vremenu, koja je bila definirana na sljedeći način:

$$\frac{dV}{dt} = \sum \text{pritok FAME} + \sum \text{pritok NH}_4 - \sum \text{uzorkovanje} \quad [13]$$

Svi pritoci su, kao i uzorkovanje, određeni su u modelu pomoću funkcije „kvadratnog pulsa“.

Koncentracija ukupnog *mcl*-PHA je određena kao zbroj svih pojedinih monomera (koji potječu od raznih FAME sadržanih u smjesi izuzetoj iz proizvodnje biodizela), pa je koncentracija pojedinih monomera uklopljenih u *mcl*-PHA izražena sljedećom jednačinom:

$$C_i = PHA * F_{C_i} \quad [14]$$

Osim diferencijalnih jednačina i funkcije kvadratnog pulsa, u izradi modela korištena je i pogodna naredba (logički operator): „IF x THEN y ELSE z“. Ova naredba je poslužila za opisivanje rasta mikroorganizma (odnosno za razdvajanje lag faze, faze rasta i stacionarne faze), biosinteze PHA, a također i za opisivanje pritoka amonijaka i dobave kisika.

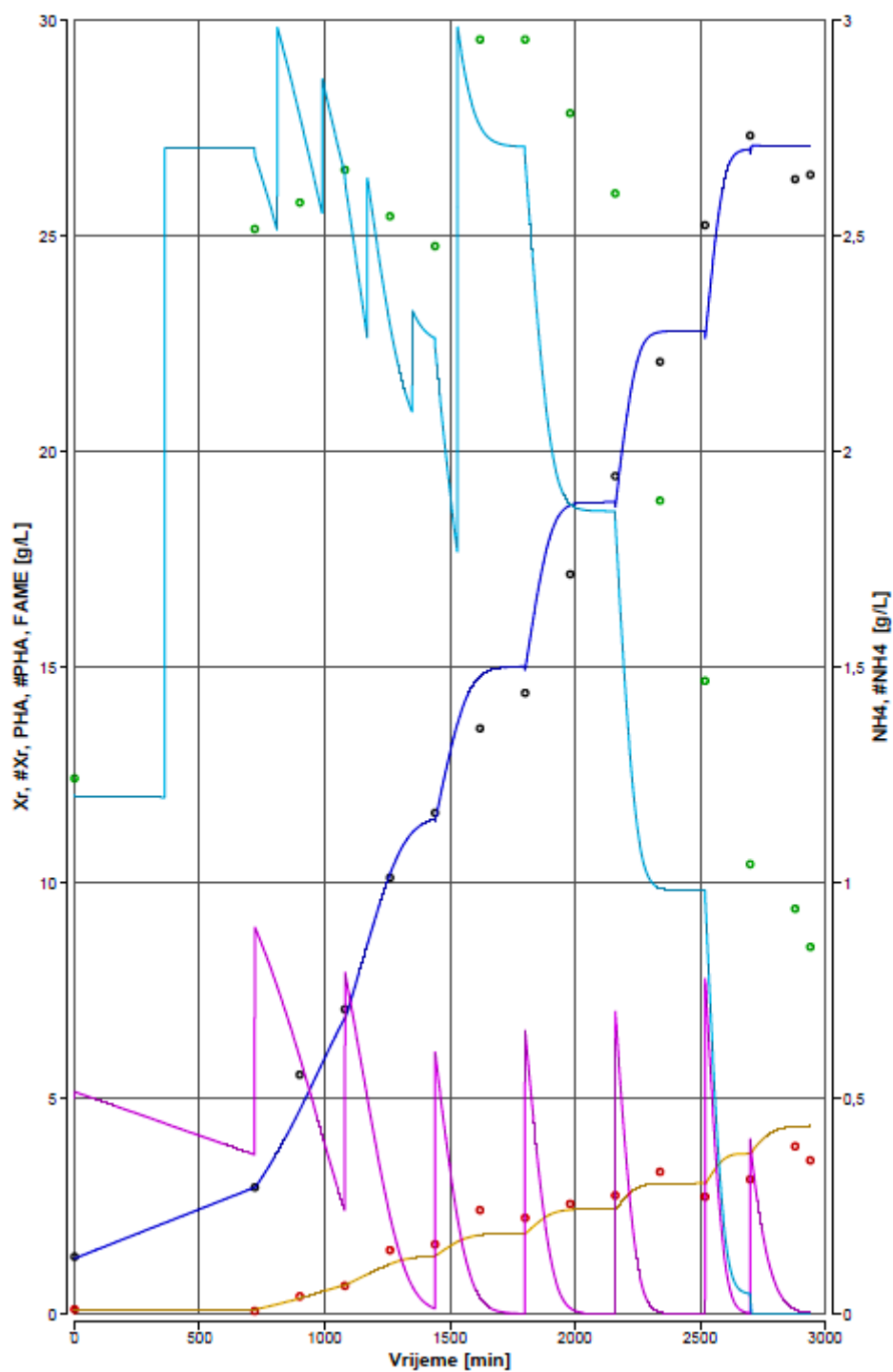
U prilogu ovog diplomskog rada (pod točkom 7.) se nalaze svi matematički modeli u obliku u kojem su bili unešeni u računalnom programu Berkeley Madonna.

4.2.Simulacija procesa biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332 matematičkim modelom i usporedba s eksperimentalnim rezultatima

U ovom dijelu rada prikazani su rezultati matematičkog modeliranja uzgoja *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332 u svrhu biosinteze *mcl*-PHA. Na dijagramima se nalaze krivulje koje označavaju izračunate vrijednosti za ključne biološke varijable (dobivene simulacijom), kao i eksperimentalne (izmjerene) vrijednosti istraživanih varijabli. Slaganje izračunatih vrijednosti za varijable i eksperimentalnih podataka, kriterij je za ocjenjivanje uspješnosti modela.

4.2.1. Matematički model biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 – prvi uzgoj

Na **slici 5** prikazane su krivulje dobivene simulacijom biosinteze *mcl*-PHA u stanicama bakterije *P. chlororaphis* DSM 50083 te su također prikazane eksperimentalne vrijednosti određene tijekom prvog uzgoja. Prikazana je ovisnost varijabli koncentracije rezidualne biomase, koncentracije PHA, koncentracije amonijaka i koncentracije izvora C (FAME) o vremenu.

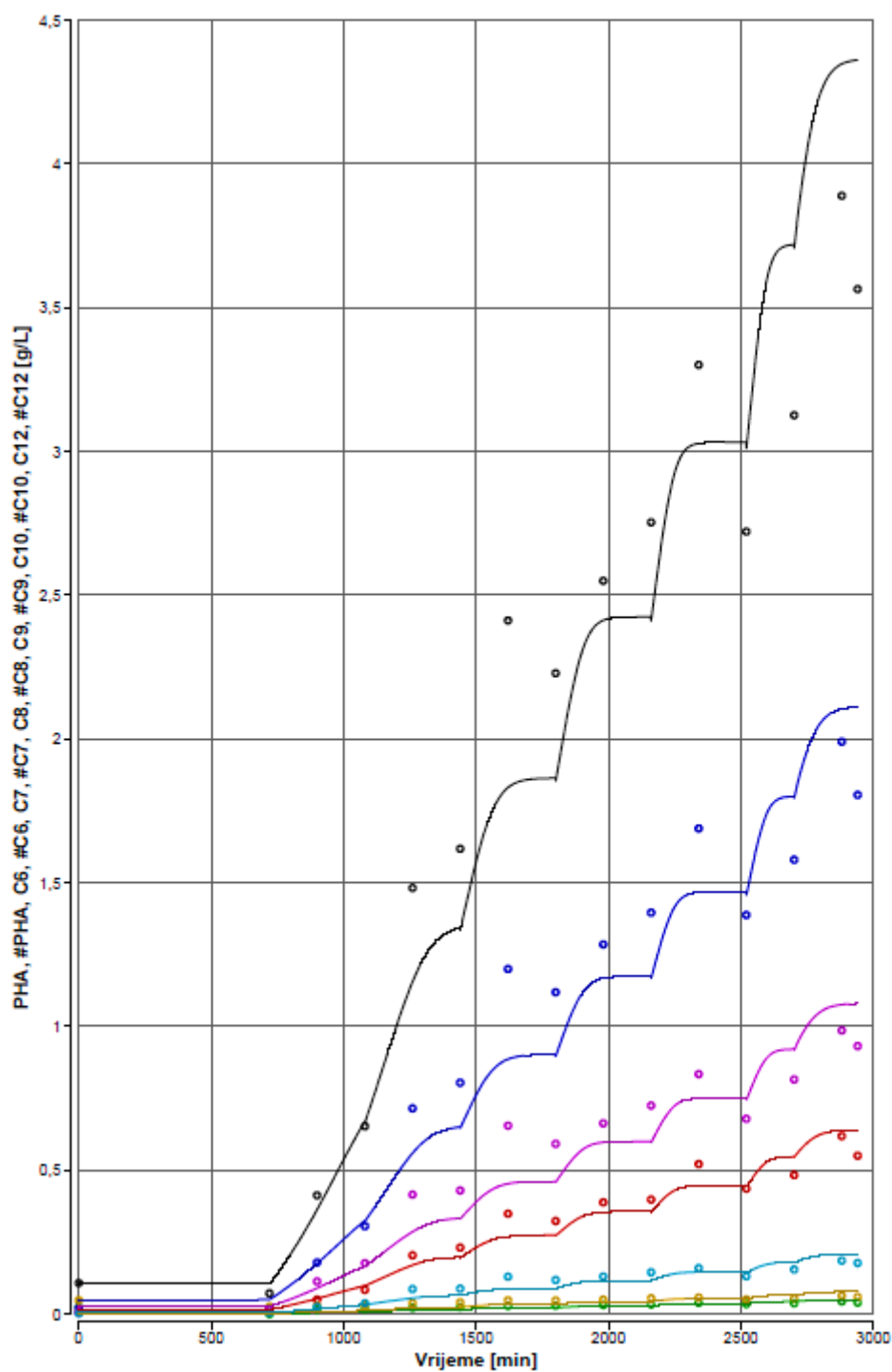


Slika 5. Rezultati simulacije biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 (prvi uzgoj) i slaganje matematičkog modela s eksperimentalnim vrijednostima tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

Legenda: (#) eksperimentalne varijable; kružići – eksperimentane vrijednosti: ○ (#PHA), ○ (rezidualna biomasa, #Xr), ○ (#NH₄⁺); linije – simulirane vrijednosti: — (PHA), — (FAME), — (rezidualna biomasa, Xr), — (NH₄⁺)

Na **slici 5** vidljivo je relativno dobro slaganje trendova modelnih krivulja i eksperimentalnih vrijednosti. Prema eksperimentalnim podacima vidljivo je da je lag faza bila relativno duga, ali njen završetak nemoguće je točno utvrditi jer do 12 h uzgoja (720 min) nije bilo izuzimanja uzorka. Nakon toga rast (rezidualne) biomase ($\#X_r$) je tijekom prve faze uzgoja bio gotovo linearan (faza karakterizirana dovoljnom koncentracijom FAME u podlozi, koja je trajala do 27 h /1620 min/). No izrazito isprekidana ljubičasta linija koja reprezentira koncentraciju izvora C (FAME) nakon te vremenske točke upozorava na nedovoljno dodavanje FAME u podlogu. Naime FAME su dodavani prekasno od 1400 minute pa sve do kraja uzgoja. Eksperimentalni podaci za koncentraciju amonijevih iona također ukazuju da se koncentracija izvora N nije spustila na vrijednost koja bi limitirala rast (i pojačala sintezu PHA!) pa se rast rezidualne biomase nastavio i nakon 27 h uzgoja. Suvišak izvora N u posljednjoj trećini uzgoja indicira da je nedostatak FAME i neizbalansirani prtok izvora N glavni problem u ovom uzgoju. Osim svega navedenog, na ovom dijagramu vidljivo je da se brzina biosinteze PHA nije povećala u drugoj fazi uzgoja, najvjerojatnije zbog inhibicije biosinteze amonijakom (koncentracija amonijaka ni tijekom faze biosinteze PHA nije pala na vrijednost koja bi limitirala rast biomase i omogućila intenzivniju biosintezu PHA).

Na **slici 6** prikazane su eksperimentalne vrijednosti koncentracije ukupnog *mcl*-PHA i koncentracije pojedinih monomera različite duljine C-lanca prisutnih u ukupnom *mcl*-PHA (za prvi uzgoj). Prikazane su i krivulje navedenih varijabli dobivene simulacijom uporabom matematičkog modela biosinteze *mcl*-PHA za navedeni uzgoj.



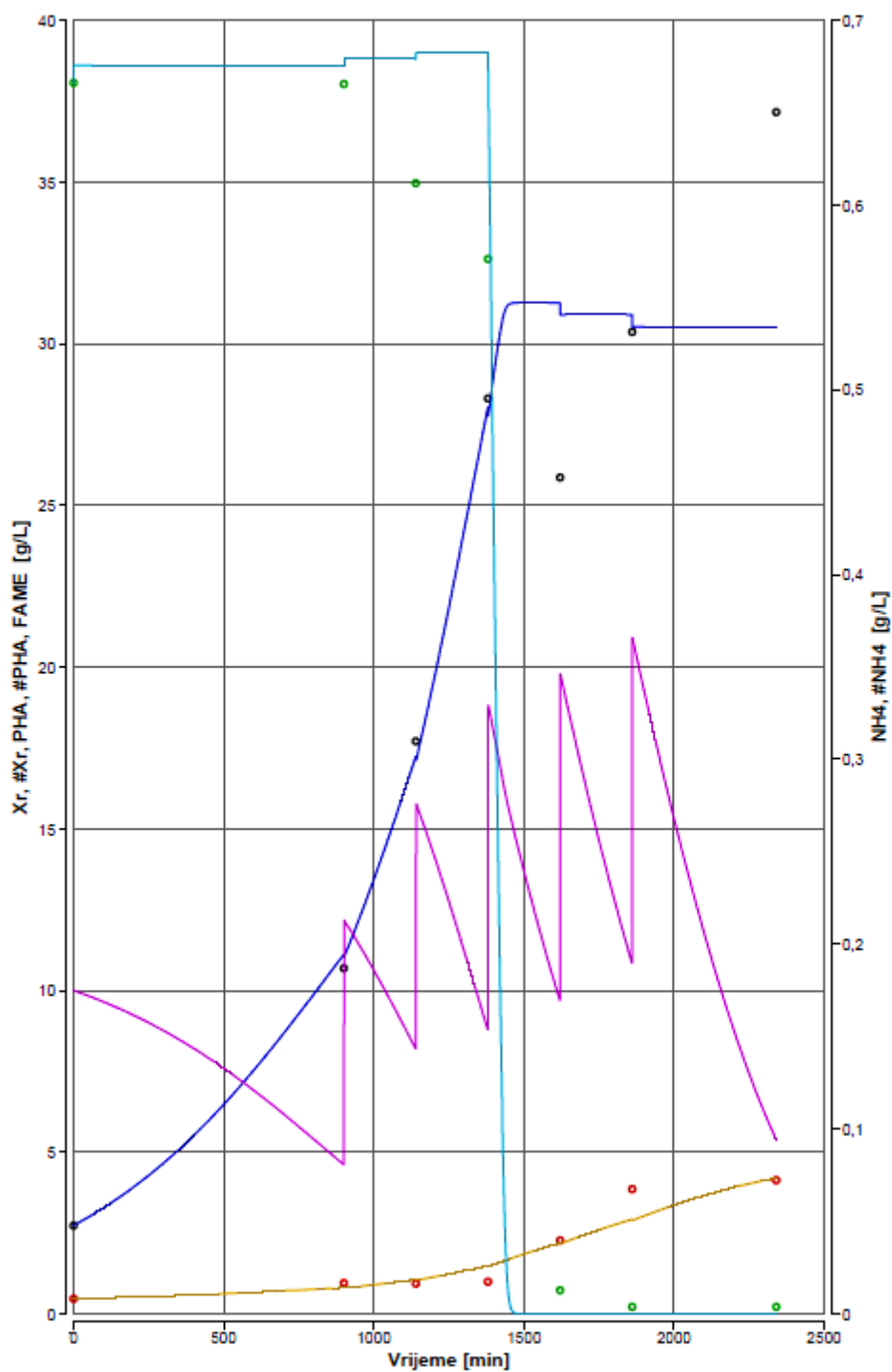
Slika 6. Prikaz rezultata simulacije (krivulje) i eksperimentalnih vrijednosti (kružići) koncentracije *mcl*-PHA i pripadnih monomera različitih duljina bočnih C-lanaca u uzgoju *P. chlororaphis* DSM 50083 (prvi uzgoj).

Legenda: (#) eksperimentalne varijable; ○, — (ukupni *mcl*-PHA), ○, — (3-hidroksiheksanoat, C₆), ○, — (3-hidroksiheptanoat, C₇), ○, — (3-hidroksioktanoat, C₈), ○, — (3-hidroksinonenoat, C₉), ○, — (3-hidroksidekanoat, C₁₀), ○, — (3-hidroksidodekanoat, C₁₂)

Iz **slike 6** vidljivo je da postoji relativno dobro slaganje između eksperimentalnih podataka i modelnih krivulja. U strukturi *mcl*-PHA najveći udio ima monomer 3-hidroksioktanoat (C₈). Vidljivo je da modelom nije postignuto prisutno variranje koncentracije ukupnog *mcl*-PHA kao ni variranje koncentracije prisutnih monomera. Krivulje imaju bez sumnje dobar trend u vremenu i dobro slijede eksperimentalne podatke. No, evidentan je značajan rasap eksperimentalnih vrijednosti oko krivulja dobivenih matematičkim modelom. Za taj rasap postoje dva moguća objašnjenja: (a) rasap je posljedica analitičke metode i kompliciranog postupka izolacije PHA, (b) rasap je posljedica nepravilnog dodavanja FAME odnosno posljedica postojanja vremenskih perioda u uzgoju s nedostatnom koncentracijom izvora C. Poznato je da mikroorganizmi producenti mogu akumulirati određeni maksimalni udio PHA, ali i aktivirati njegovu razgradnju i potrošnju kada nema dovoljno vanjskih izvora C (Muhr i sur., 2013a). Modelom nije bilo moguće postići rasipanje rezultata koncentracije PHA jer u model nije bila ugrađena jednačba koja bi opisivala ovaj intracelularni događaj.

4.2.2. Matematički model biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 – drugi uzgoj

Na **slici 7** prikazani su rezultati matematičke simulacije i realnog uzgoja bakterije *P. chlororaphis* DSM 50083 u svrhu konverzije FAME u *mcl*-PHA. Uzgoj prikazan na **slici 7** razlikuje se od prethodnog po tome što je na početku uzgoja koncentracija FAME bila dvostruko veća nego u prvom uzgoju (10g/L prema 5 g/L). Time se htjelo izbjeći da tijekom uzgoja dođe do limitacije izvorom C kako je bilo utvrđeno u prvom uzgoju.

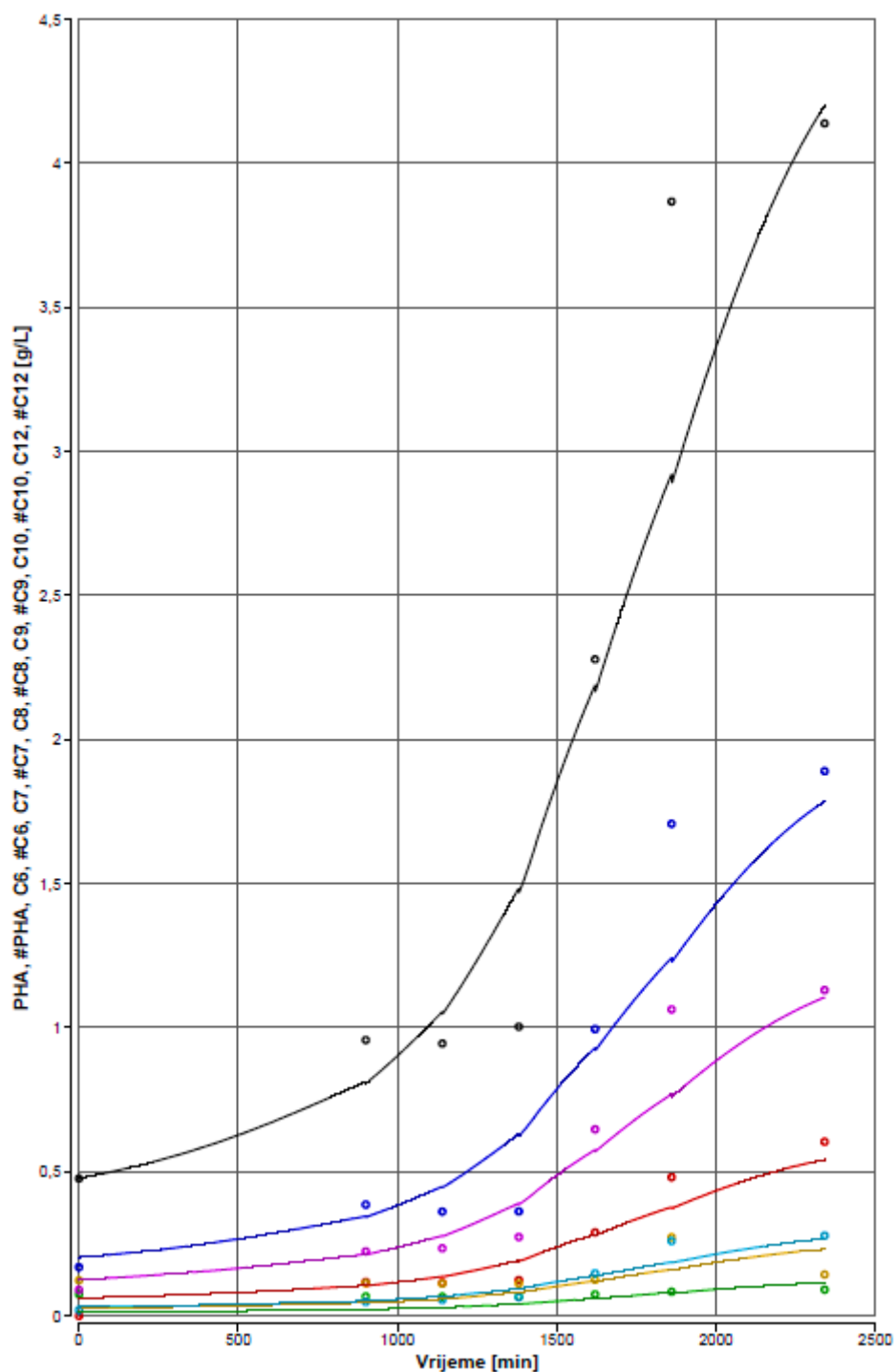


Slika 7. Rezultati simulacije biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 (drugi uzgoj) i slaganje matematičkog modela s eksperimentalnim vrijednostima tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

Legenda: (#) eksperimentalne varijable; kružići – eksperimentane vrijednosti: \circ ($\#PHA$), \bullet (rezidualna biomasa, $\#X_r$), \circ ($\#NH_4^+$); linije – simulirane vrijednosti: — (PHA), — (FAME), — (rezidualna biomasa, X_r), — (NH_4^+)

Rezultati prikazani na **slici 7** upućuju na dobro slaganje modelnih krivulja (simuliranih vrijenosti) i eksperimentalnih vrijednosti za varijablu koncentracije rezidualne biomase u fazi intenzivnog rasta (kad nije bilo limitacije s izvorom N) kao i na solidno slaganje simuliranih i eksperimentalnih vrijednosti za ukupne *mcl*-PHA. No, krivulja za koncentraciju amonijevog iona ima određeno neslaganje obzirom na eksperimentalne rezultate: općenito, trend se slaže s eksperimentalnim rezultatima, ali je pad koncentracije u simulaciji znatno brži nego u eksperimentu (u momentu kad je namjerno izazvana limitacija rasta izvorom N u svrhu povećanja brzine sinteze PHA). Nadalje, eksperimentalni podaci ukazuju na rast rezidualne biomase i u fazi intenzivne biosinteze PHA (tj. nakon 23 h, odnosno 1380 min) iako je koncentracija amonijaka (izvora dušika za rast biomase) gotovo na nuli. Teoretski je nemoguć rast koncentracije rezidualne biomase bez prisutnog izvora N pa je to razlog za neslaganje modela i eksperimenta. Ovakvi rezultati upućuju na probleme u određivanju koncentracije rezidualne biomase. Ta se varijabla dobiva kao razlika dvije eksperimentalne vrijednosti: ukupne suhe tvari biomase i *mcl*-PHA. Pretpostavka je da zbog povećane koncentracije FAME postoji mogućnost da fizičkom adsorpcijom FAME na biomasu dolazi do greške u određivanju ukupne suhe tvari biomase pa onda i posljedično do greške u izračunu za rezidualnu biomasu. Ovaj matematički model je pokazao da se s pritokom izvora C (FAME) nije kasnilo, drugim riječima FAME su konstantno bili u suvišku, a posljedica takvog vođenja uzgoja jest nešto viša koncentracija PHA na kraju uzgoja i ranije postignuta maksimalna koncentracija.

Na **slici 8** prikazane su eksperimentalne vrijednosti promjene koncentracije *mcl*-PHA u tijeku šaržnog uzgoja s pritokom supstrata bakterije *P. chlororaphis* DSM 50083 kao i koncentracije pojedinih monomera *mcl*-PHA.



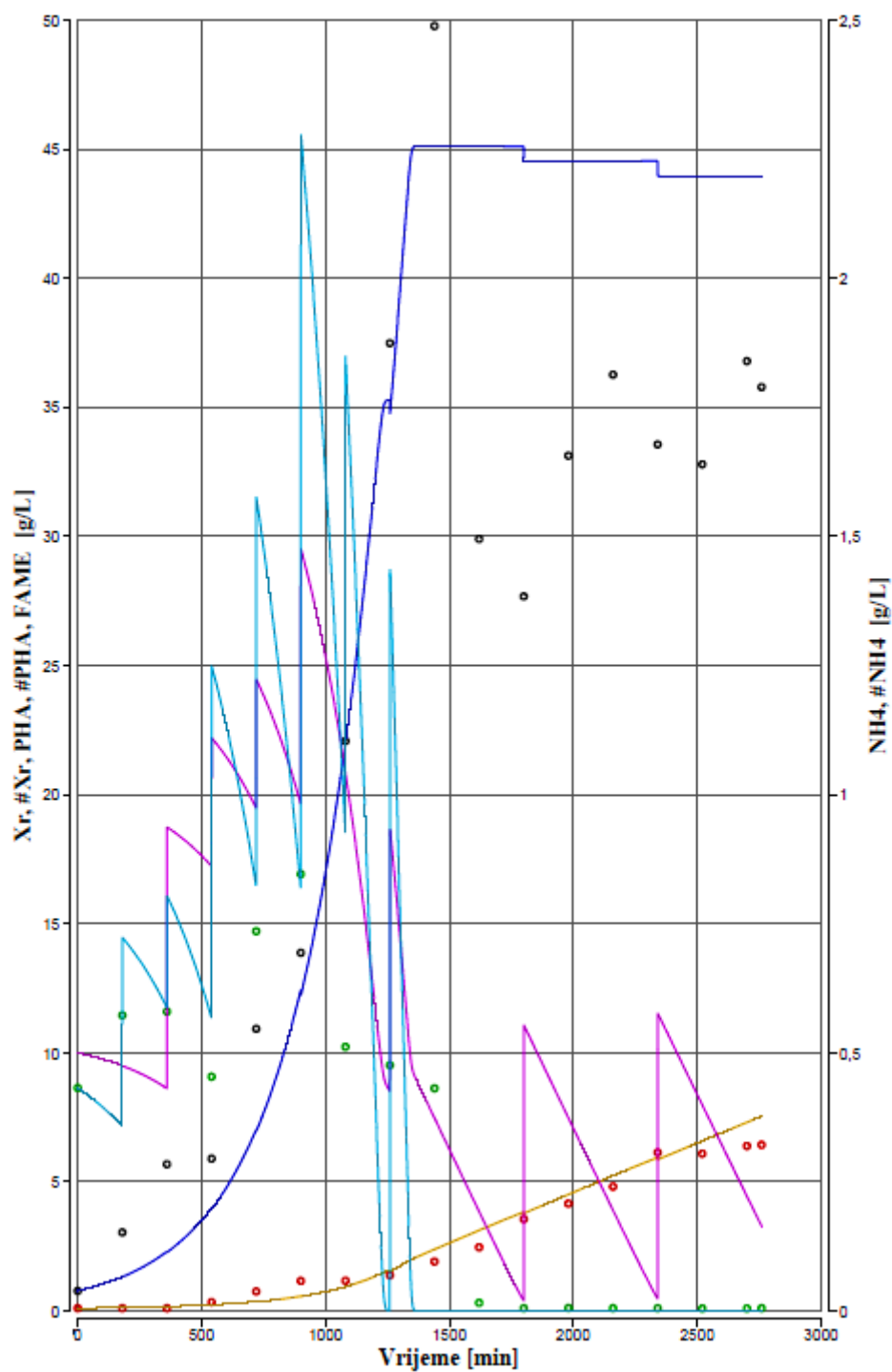
Slika 8. Prikaz rezultata simulacije (krivulje) i eksperimentalnih vrijednosti (kružići) koncentracije *mcl*-PHA i pripadnih monomera različitih duljina bočnih C-lanaca u uzgoju *P. chlororaphis* DSM 50083 (drugi uzgoj).

Legenda: (#) eksperimentalne varijable; ○, — (ukupni *mcl*-PHA), ○, — (3-hidroksiheksanoat, C₆), ○, — (3-hidroksiheptanoat, C₇), ○, — (3-hidroksioktanoat, C₈), ○, — (3-hidroksinonenoat, C₉), ○, — (3-hidroksidekanoat, C₁₀), ○, — (3-hidroksidodekanoat, C₁₂)

Slika 8 pokazuje dobro slaganje između eksperimentalnih vrijednosti i krivulja dobivenih simulacijom. U drugoj fazi uzgoja, vidljivo je povećanje brzine biosinteze PHA zbog smanjenja koncentracije amonijaka koji je u realnom sustavu „provokator“ pojačane sinteze, a u modelu je postavljen kao inhibitor biosinteze PHA. Ipak, nakon nastupanja faze ograničavanja rasta niskom koncentracijom dušika, brzina sinteze PHA je više porasla u eksperimentu nego u modelu. Najzastupljeniji monomer u strukturi *mcl*-PHA je 3-hidroksioktanoat (C₈), pa slijede redom 3-hidroksidekanoat (C₁₀), 3-hidroksiheksanoat (C₆), 3-hidroksidodekanoat (C₁₂), 3-hidroksinonenoat (C₉) i 3-hidroksiheptanoat (C₇).

4.2.3. Matematički model biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 – treći uzgoj

Eksperimentalni rezultati treće kultivacije bakterije *P. chlororaphis* DSM 50083 tehnikom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata, kao i rezultati matematičke simulacije, prikazani su na **slikama 9 i 10**.



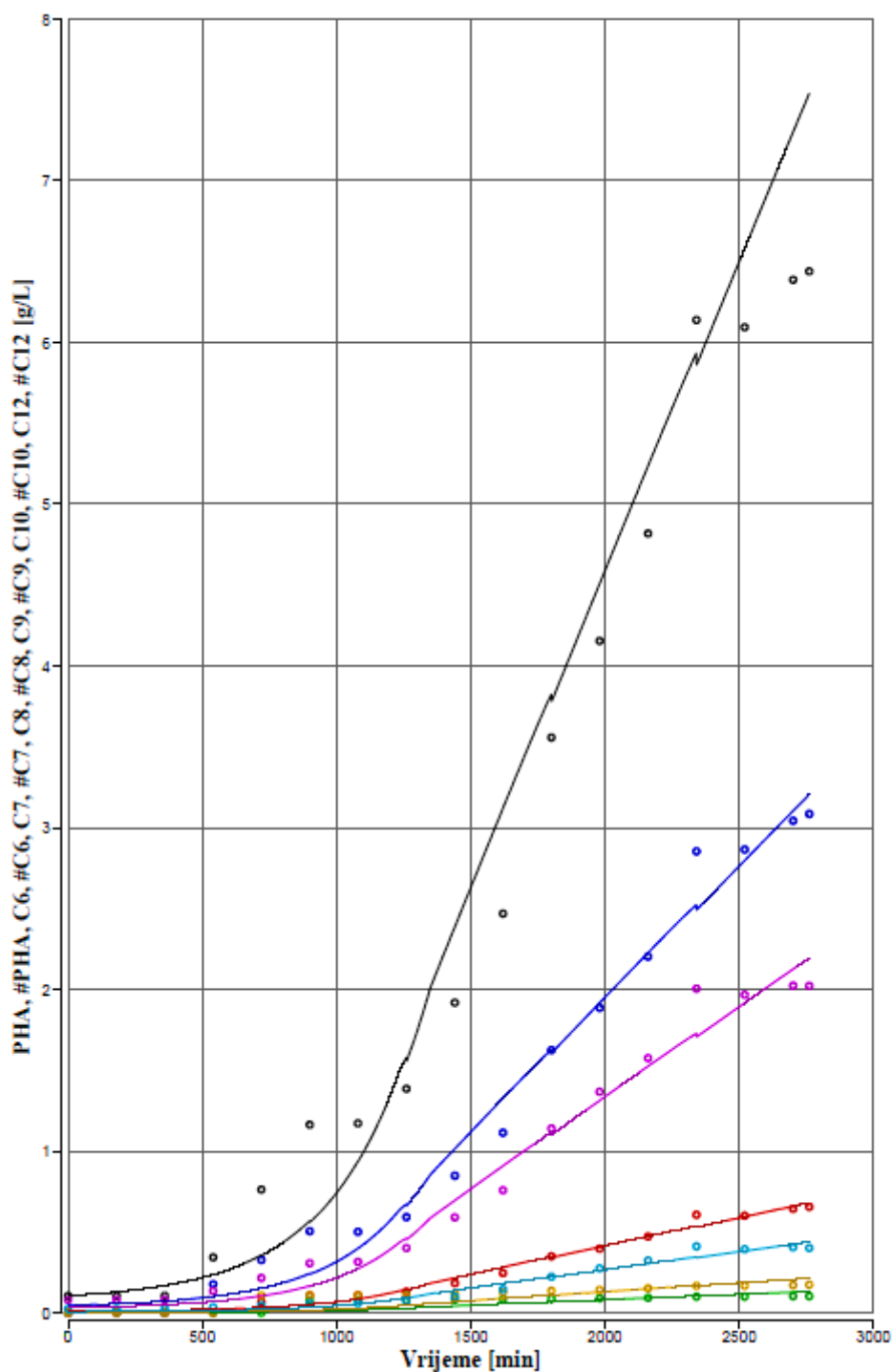
Slika 9. Rezultati simulacije biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 (treći uzgoj) i slaganje matematičkog modela s eksperimentalnim vrijednostima tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

Legenda: (#) eksperimentalne varijable; kružići – eksperimentane vrijednosti: ○ (#PHA), ○ (rezidualna biomasa, #Xr), ○ (#NH₄⁺); linije – simulirane vrijednosti: — (PHA), — (FAME), — (rezidualna biomasa, Xr), — (NH₄⁺)

U tom uzgoju je pokušano primijeniti pozitivna iskustva iz prve dvije kultivacije: početna koncentracija FAME podešena je na 10 g/L a regulacija pH pritokom NH_4OH postavljena je na pritok u „sitnijim koracima“. Prema **slici 9** vidljivo je da slaganje modelne krivulje i eksperimentalnih vrijednosti za varijablu koncentracije rezidualne biomase nije u potpunosti dobro. Eksperimentalni podaci ukazuju na nagli eksponencijalni rast X_r tijekom prve faze uzgoja te nagli pad koncentracije X_r tijekom prva tri sata faze biosinteze PHA (faza biosinteze PHA počinje u 24 h, odnosno u 1440 min). Nakon 27 h očituje se ponovno blagi rast X_r , ali i značajni rasap rezultata do kraja uzgoja (u periodu kad nema izvora N pa bi ta varijabla morala imati konstantnu vrijednost!). Ovakve rezultate moguće je objasniti s nekoliko razloga: (a) Moguća je autoliza biomase uslijed nedostatka izvora dušika za rast (koncentracija je tijekom faze biosinteze PHA gotovo jednaka nuli!) što uz eventualno prekasni pritok izvora C može imati takve posljedice. Daljnji povremeni blagi rast se zatim vjerojatno odvijao na autolizatu biomase. (b) Obzirom da u vremenskom pojasu od 24-tog sata, odnosno od 1440 min pa do kraja uzgoja postoji značajna varijacija koncentracije rezidualne biomase (28-50 g/l), a tako veliki raspon koncentracija je teško objasniti rastom na hidrolizatu, postoji mogućnost sustavne greške u određivanju te varijable (adsorpcija FAME, komplicirana tehnika izolacije PHA). U svakom slučaju, za taj vremenski pojas moguće je pretpostaviti konstantnost rezidualne biomase na razini od oko 32 – 35 g/L. (c) Moguće je također i da je koncentracija X_r u 1440 min pogrešno određena, jer odskaka od svih drugih kasnijih vrijednosti.

Krivulje dobivene matematičkim modelom za rezidualnu biomasu pokazuju određeno neslaganje s eksperimentalnim rezultatima za početnu fazu uzgoja (rast biomase), ali i neslaganje za završnu fazu uzgoja (PHA sintezu). Variranjem parametara moglo se postići bolje slaganje u početnoj fazi uzgoja, ali na štetu uz još veće neslaganje u završnoj fazi uzgoja (i obrnuto, podešavanjem parametara u korist slaganja s rezultatima završne faze izazvalo je značajnije neslaganje s rezultatima u početnoj fazi uzgoja). Nadalje, krivulju simuliranih rezultata za amonijev ion vrlo je teško ispravno ocijeniti obzirom na eksperimentalne rezultate. Tu jednostavno ne postoji dovoljna učestalost mjerenja koncentracije amonijevog iona, posebno u prijelaznoj fazi kad je namjerno izazvan prekid pritoka amonijeve lužine. Što se pak tiče rezultata određivanja *mcl*-PHA, u ovom pokusu se kao i u prethodna dva uzgoja simulirana krivulja dobro slaže s eksperimentalnim rezultatima. Pritok FAME je tijekom uzgoja bio pravovremeni.

Na **slici 10** u ovisnosti o vremenu su prikazane krivulje koncentracije *mcl*-PHA izračunate matematičkim modelom, koncentracije pojedinih monomera različite dužine bočnog lanca i eksperimentalne vrijednosti spomenutih varijabli.



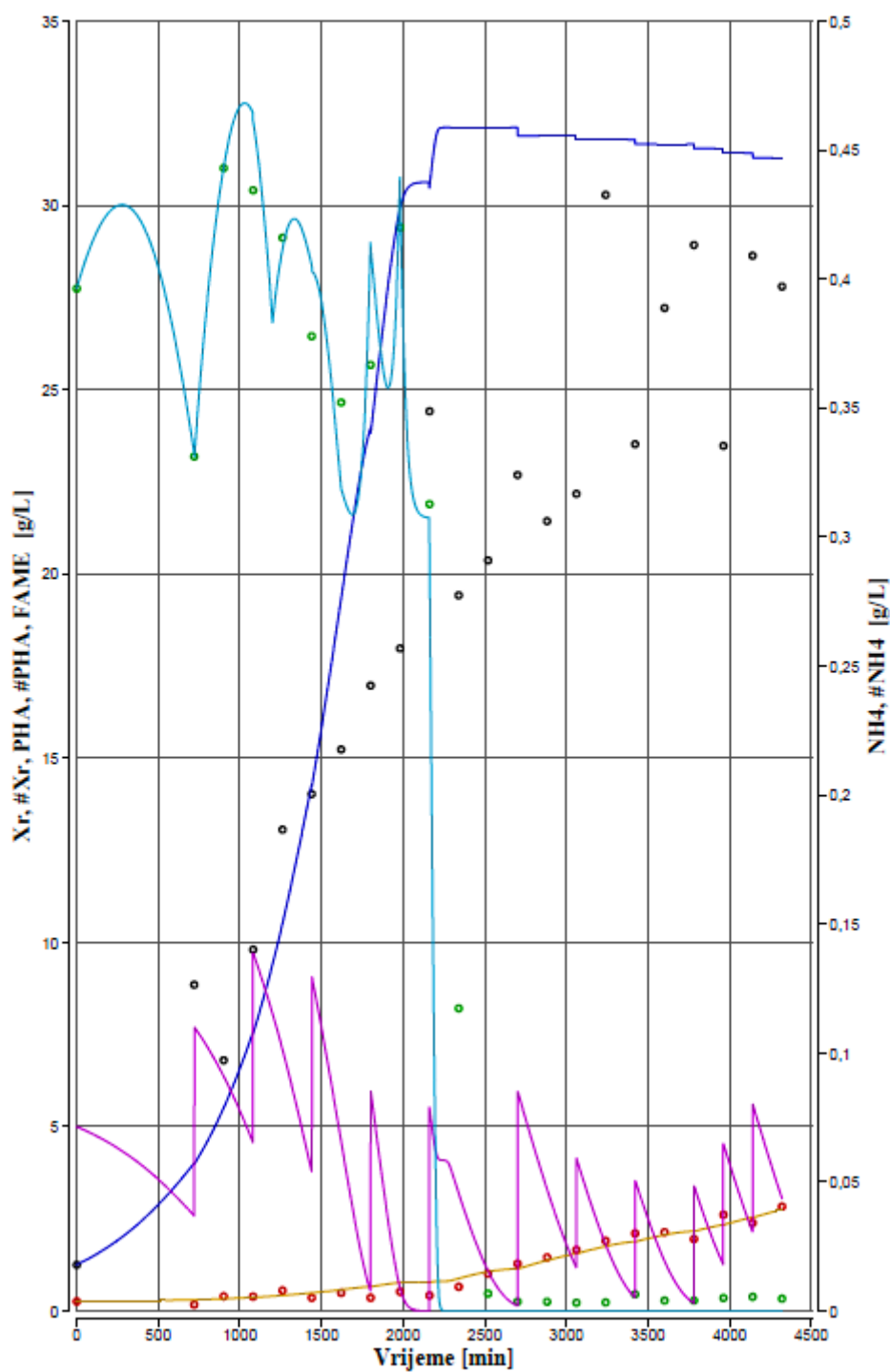
Slika 10. Prikaz rezultata simulacije (krivulje) i eksperimentalnih vrijednosti (kružići) koncentracije *mcl*-PHA i pripadnih monomera različitih duljina bočnih C-lanaca u uzgoju *P. chlororaphis* DSM 50083 (treći uzgoj).

Legenda: (#) eksperimentalne varijable; ○, — (ukupni *mcl*-PHA), ○, — (3-hidroksiheksanoat, C₆), ○, — (3-hidroksiheptanoat, C₇), ○, — (3-hidroksioktanoat, C₈), ○, — (3-hidroksinonenoat, C₉), ○, — (3-hidroksidekanoat, C₁₀), ○, — (3-hidroksidodekanoat, C₁₂)

Slika 10 prikazuje dobro slaganje eksperimentalnih vrijednosti i modelom dobivenih krivulja. Ipak, vidljivo je određeno neslaganje eksperimentalnih i modelnih rezultata u fazi rasta biomase i to za ukupne *mcl*-PHA i dva najzastupljenija monomera (C₈ i C₁₀). Nakon nastupanja ograničavanja rasta izvorom N (s početkom u 1440-toj minuti uzgoja), primijećena je konstantnost brzine sinteze PHA. Najzastupljeniji monomer *mcl*-PHA je opet 3-hidroksioktanoat (C₈).

4.2.4. Matematički model biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. citronellolis* DSM 50332 – prvi uzgoj

Na **slici 11** prikazane su krivulje koncentracije rezidualne biomase, PHA, amonijaka i izvora C (FAME) u ovisnosti o vremenu, dobivene matematičkim modelom biosinteze *mcl*-PHA za prvi uzgoj stanica bakterije *P. citronellolis* DSM 50332. Na ovoj slici su ujedino prikazane i eksperimentalne vrijednosti navedenih varijabli.

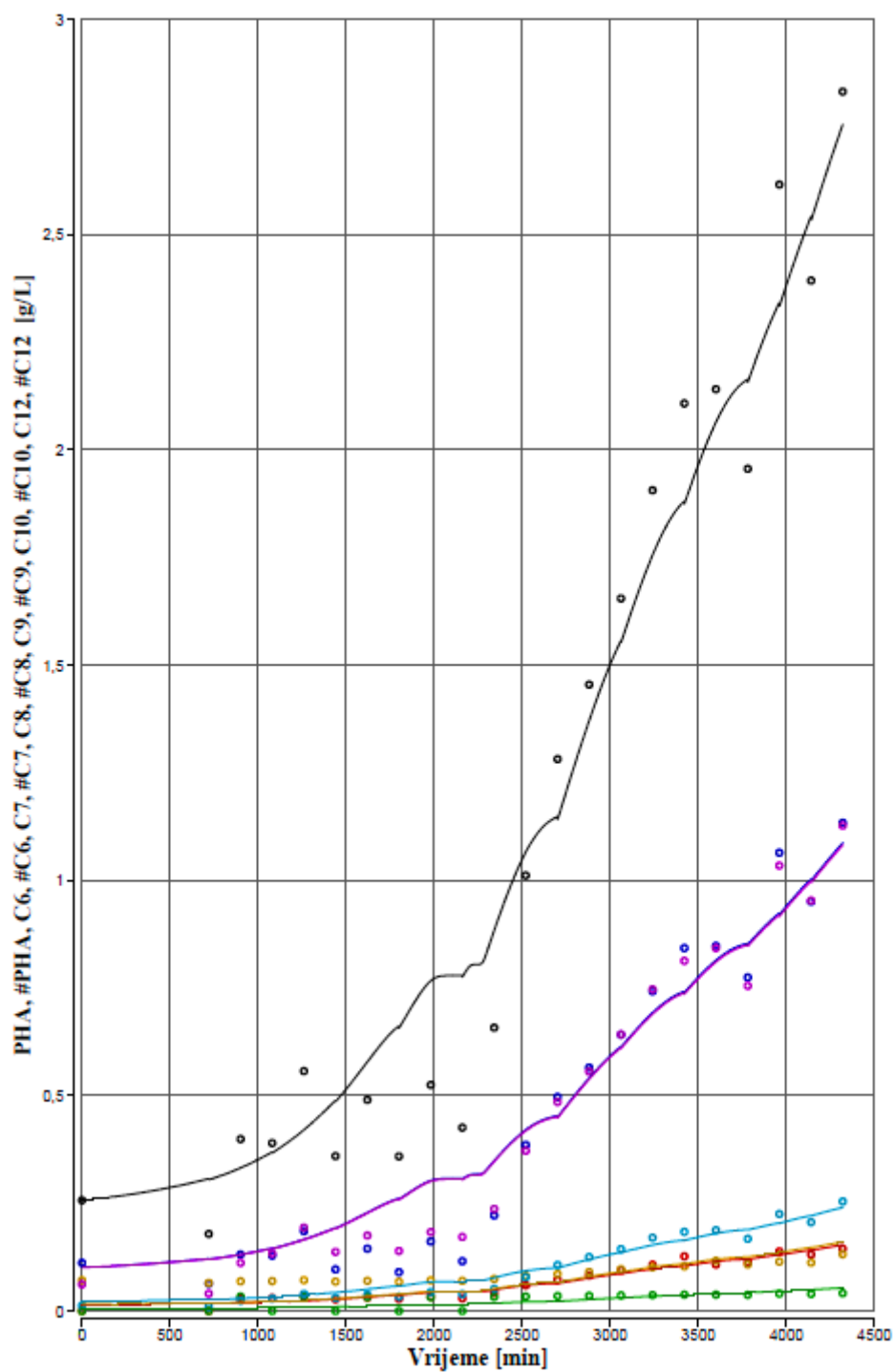


Slika 11. Rezultati simulacije biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. citronellolis* DSM 50332 (prvi uzgoj) i slaganje matematičkog modela s eksperimentalnim vrijednostima tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

Legenda: (#) eksperimentalne varijable; kružići – eksperimentane vrijednosti: ○ (#PHA), ○ (rezidualna biomasa, #Xr), ○ (#NH₄⁺); linije – simulirane vrijednosti: — (PHA), — (FAME), — (rezidualna biomasa, Xr), — (NH₄⁺)

Rezultati prikazani na **slici 11** ukazuju na relativno loše slaganje modelne (simulirane) krivulje i eksperimentalnih vrijednosti za varijablu rezidualne biomase. Eksperimentalni podaci za tu varijablu su takvi da bi eksponencijalna krivulja mogla biti zamijenjena s dva pravca različitog nagiba, jedan za fazu rasta i drugi za fazu biosinteze PHA. U ovom slučaju je prtok izvora C (FAME) bio pravovremeni pa se linearan rast biomase u prvoj fazi uzgoja ne može pripisati nedostatnom pritoku FAME. Ta linearnost je za fazu neograničavanog rasta možda posljedica heterogenosti sustava (FAME je hidrofoban supstrat pa njegova dostupnost za stanice ovisi o stupnju emulgirivosti). No, promjena strmine pravca nakon nastupanja limitacije izvorom N kao i znatan rasap rezultata ukazuje na znatne probleme u metodi eksperimentalnog određivanja rezidualne biomase! Odstupanje eksperimentalnih i modelnih vrijednosti za tu varijablu posebno je uočljivo u fazi ograničavanja rasta izvorom N. Brzina rasta rezidualne biomase tijekom te druge faze uzgoja je i dalje visoka iako je koncentracija amonijaka (izvora dušika za rast) jednaka nuli. Zapravo, u toj fazi rasta ne bi trebalo ni biti jer u podlogi nema više izvora N. Naime, dok je eksperimentalna greška u analizi uvijek moguća, matematički model ne može rezultirati rastom biomase ako jedan od ograničavajućih supstrata nije prisutan u podlozi. Relativno velika fluktuacija u eksperimentalnim vrijednostima koncentracije rezidualne biomase ukazuje na moguću autolizu biomase te opetovni rast biomase na vlastitom autolizatu. No ova hipoteza je vrlo upitna jer bi u tom slučaju postojale i znatne varijacije u vrijednostima za PHA, što nije slučaj. Za razliku od rezidualne biomase, eksperimentalne vrijednosti za PHA i koncentraciju amonijaka se dobro slažu s vrijednostima dobivenih izračunom matematičkim modelom.

Na **slici 12** vidljiv je tijek promjene eksperimentalnih vrijednosti koncentracije *mcl*-PHA i koncentracije monomera uklopljenih u strukturu *mcl*-PHA o vremenu (eksperimentalni podaci dobiveni tijekom prvog uzgoja *P. citronellolis* DSM 50332). Na ovoj slici prikazane su i krivulje za navedene varijable dobivene simulacijom.



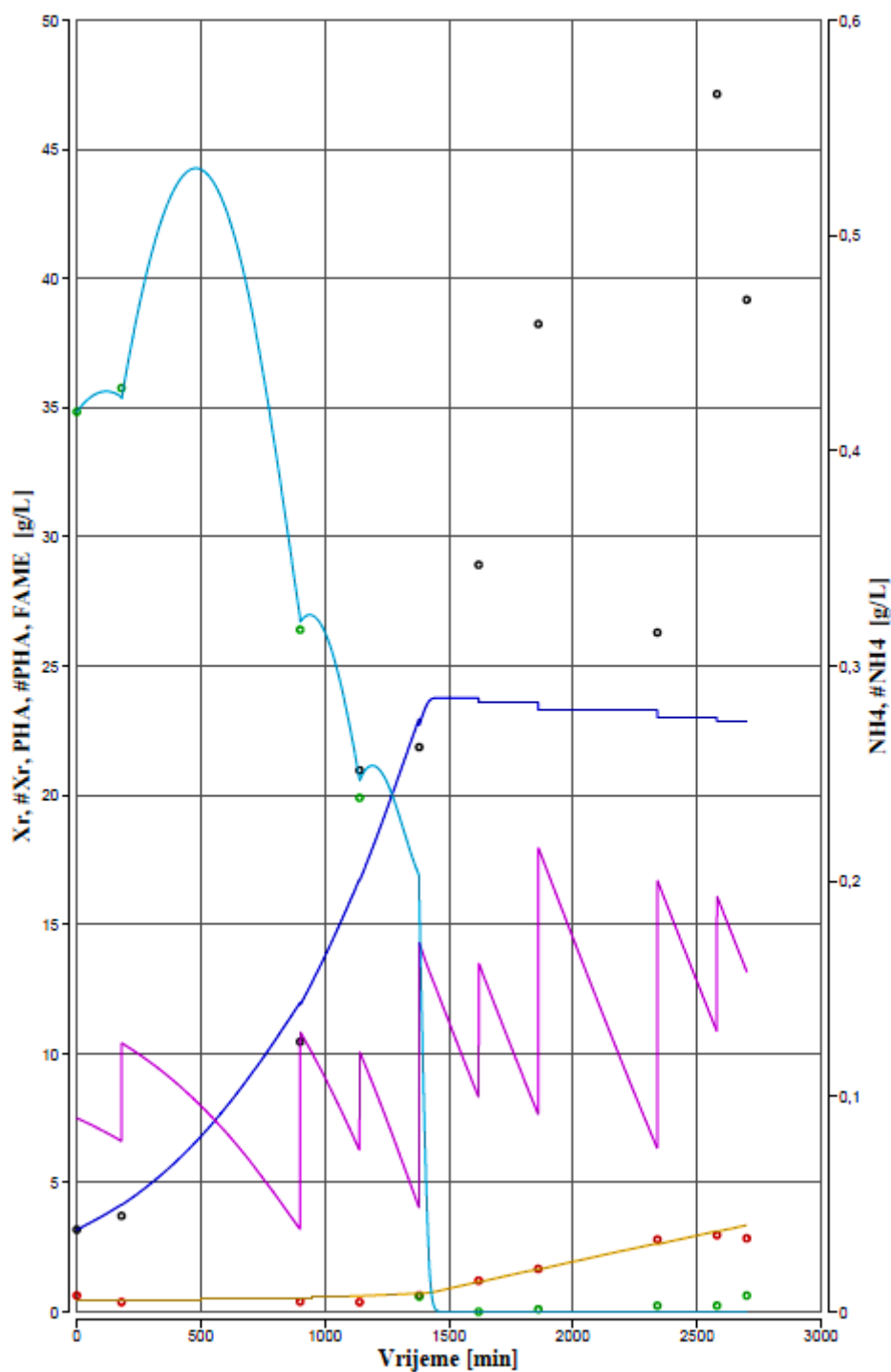
Slika 12. Prikaz rezultata simulacije (krivulje) i eksperimentalnih vrijednosti (kružići) koncentracije *mcl*-PHA i pripadnih monomera različitih duljina bočnih C-lanaca u uzgoju *P. citronellolis* DSM 50332 (prvi uzgoj).

Legenda: (#) eksperimentalne varijable, — (ukupni *mcl*-PHA), ○, — (3-hidroksiheksanoat, C₆), ○, — (3-hidroksiheptanoat, C₇), ○, — (3-hidroksioktanoat, C₈), ○, — (3-hidroksinonenoat, C₉), ○, — (3-hidroksidekanoat, C₁₀), ○, — (3-hidroksidodekanoat, C₁₂)

Na **slici 12** vidljivo je dobro slaganje modelnih krivulja i eksperimentalnih vrijednosti. Vidljiv je i bitni porast brzine biosinteze PHA u drugoj fazi uzgoja. U ovom uzgoju najbrojniji monomeri u strukturi *mcl*-PHA su 3-hidroksioktanoat (C₈) i 3-hidroksidekanoati (C₁₀) s izjednačenim udjelom. Ipak, može se primijetiti znatan rasap eksperimentalnih vrijednosti za ukupni PHA kao i za dva najzastupljenija monomera na početku uzgoja (u fazi intenzivnog rasta biomase).

4.2.5. Matematički model biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. citronellolis* DSM 50332 – drugi uzgoj

Rezultati drugog uzgoja *P. citronellolis* DSM 50332 u svrhu biosinteze *mcl*-PHA iz FAME prikazani su zajedno sa simuliranim vrijednostima na **slikama 13 i 14**.

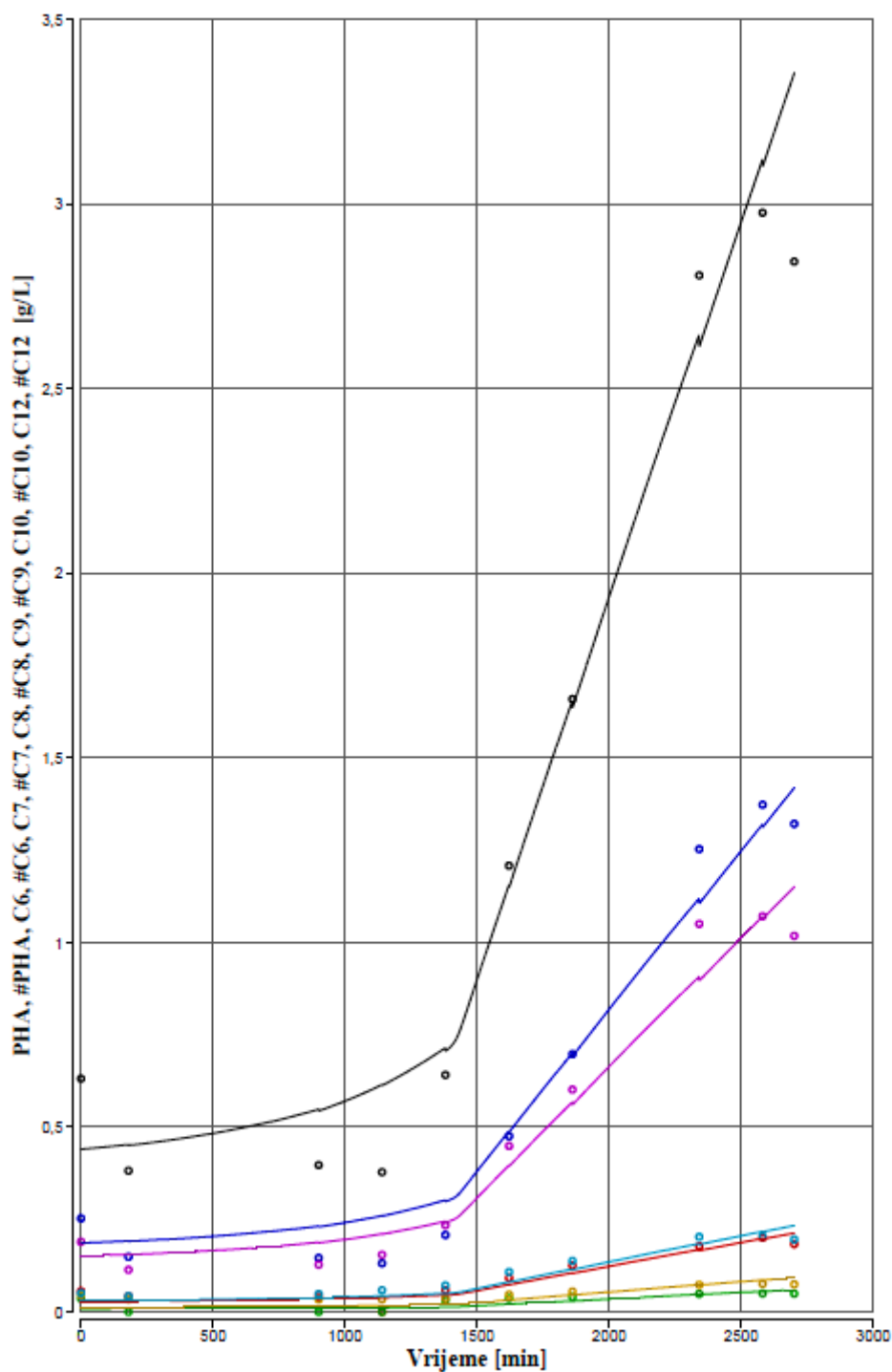


Slika 13. Rezultati simulacije biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. citronellolis* DSM 50332 (drugi uzgoj) i slaganje matematičkog modela s eksperimentalnim vrijednostima tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

Legenda: (#) eksperimentalne varijable; kružići – eksperimentane vrijednosti: ○ (#PHA), ○ (rezidualna biomasa, #Xr), ○ (#NH₄⁺); linije – simulirane vrijednosti: — (PHA), — (FAME), — (rezidualna biomasa, Xr), — (NH₄⁺)

Na **slici 13** vidljivo je dobro slaganje eksperimentalnih vrijednosti i rezultata dobivenih matematičkim modelom za koncentraciju rezidualne biomase u prvoj fazi uzgoja (faza rasta biomase), no isto tako teško je ne primijetiti i izrazito loše slaganje u fazi intenzivne sinteze proizvoda. Biomasa je prema eksperimentalnim podacima rasla eksponencijalno tijekom prve faze uzgoja te je zatim nastavila rast tijekom druge faze uzgoja iako je u toj fazi bila bez izvora N pa realno nije ni mogla ni smjela rasti. Ovaj rezultat sličan je prethodno prikazanim podacima za obje istraživane bakterije. Očito je da u postupku određivanja rezidualne biomase postoji sustavna greška koja dolazi do izražaja u fazi pojačane sinteze *mcl*-PHA izazvane limitacijom rasta izvorom N. Ta je greška karakterizirana povećanjem mase rezidualne biomase u uvjetima kada se zbog manjka izvora N to nije smjelo događati. Zbog toga nastaju i znatne razlike između eksperimenta i modela. Izvor C (FAME) je dodavan u pritocima te je njegova koncentracija tijekom cijelog uzgoja bila u suvišku. Zbog toga je realno pretpostaviti da je povećanje biomase u uvjetima kad ga ne bi smjelo biti vjerojatno posljedica adsorpcije FAME i gravimetrijskog detektiranja te mase. Eksperimentalni rezultati za ostale dvije varijable (koncentracija *mcl*-PHA i amonijevog iona) se dobro slažu s postavljenim matematičkim modelom.

Na **slici 14** mogu se usporediti eksperimentalni i mat. modelom izračunati podaci biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. citronellolis* DSM 50332 za drugi uzgoj. Također, osim *mcl*-PHA prikazane su i koncentracije pojedinih monomera koji sačinjavaju *mcl*-PHA.



Slika 14. Prikaz rezultata simulacije (krivulje) i eksperimentalnih vrijednosti (kružići) koncentracije *mcl*-PHA i pripadnih monomera različitih duljina bočnih C-lanaca u uzgoju *P. citronellolis* DSM 50332 (drugi uzgoj).

Legenda: (#) eksperimentalne varijable, — (ukupni *mcl*-PHA), ○, — (3-hidroksiheksanoat, C₆), ○, — (3-hidroksiheptanoat, C₇), ○, — (3-hidroksioktanoat, C₈), ○, — (3-hidroksinonenoat, C₉), ○, — (3-hidroksidekanoat, C₁₀), ○, — (3-hidroksidodekanoat, C₁₂)

Na **slici 14** vidljivo je izuzetno dobro slaganje između eksperimentalnih vrijednosti i krivulja dobivenih simulacijom (matematičkim modelom). Iz dijagrama je također vidljivo da ova bakterija tijekom faze rasta praktički ne sintetizira PHA, a izrazit porast biosinteze PHA započinje u drugoj fazi uzgoja, nakon što je biosinteza biomase zaustavljena nedostatkom izvora N. Monomeri 3-hidroksioktanoat (C₈) i 3-hidroksidekanoat (C₁₀) imaju najveći i gotovo izjednačeni udio u strukturi *mcl*-PHA.

4.2.6. Usporedno razmatranje rezultata matematičkog modeliranja biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332

Danas postoje različiti modeli primjenjivi za matematičko modeliranje biosinteze PHA. Oni uglavnom služe za optimizaciju procesa proizvodnje PHA ali i za bolje razumijevanje samog tehnoloških zahvata i njihovih posljedica u procesu. Nažalost, još uvijek ne postoji niti jedan tip matematičkog modela koji točno opisuje sve karakteristike proizvodnih sojeva i značajke industrijskih procesa proizvodnje. Stoga je potrebno, koji god model da se izabere, prilagoditi ga stvarnom procesu (Novak i sur., 2015). Do sada u dostupnoj literaturi nije opisan niti jedan matematički model koji bi se bavio biosintezom *mcl*-PHA u stanicama bakterija *P. chlororaphis* ili *P. citronellolis*. To je bio razlog zbog čega je u ovom radu primijenjen formalno kinetčki tip matematičkih modela te je pažnja bila usmjerenja k razmatranju kinetike rasta ovih mikroorganizama i biosinteze PHA.

Tijekom primjene ovih matematičkih modela uočen je u više pokusa rast rezidualne biomase i u uvjetima limitacije rasta izvorom dušika (amonijakom). Ovaj problem nije bio uočen u modeliranju prvog uzgoja bakterije *P. chlororaphis* pošto koncentracija amonijaka nije u tom uzgoju pala na dovoljno nisku razinu koja bi limitirala rast biomase.

Problem neslaganja modela i eksperimentalnih vrijednosti za rezidualnu biomasu i rast biomase i u uvjetima limitacije izvorom dušika (kad ne bi trebao postojati), može se objasniti na nekoliko načina:

- a) moguća je pogreška prilikom određivanja koncentracije biomase ili amonijaka,
- b) postoji mogućnost da je biomasa apsorbirala amonijak na svoju staničnu stjenku te ga u filtratu nije više bilo moguće dokazati, a biomasa je apsorbirani amonijak dalje koristila kao izvor za rast,
- c) biomasa je možda bila u limitaciji dušikom i zbog toga djelomično autolizirala, pa je dalje kao izvor dušika za rast koristila proteine iz autolizata (u svakom uzgoju /osim

prvog/ vidljiv je pad koncentracije rezidualne biomase prilikom prvog uzorkovanja u fazi biosinteze PHA tj. u drugoj fazi uzgoja),

- d) povećanje biomase u uvjetima kad ga ne bi smjelo biti može biti i posljedica adsorpcije FAME na stanice i gravimetrijskog detektiranja te mase.

U ovom matematičkom modelu nije bila ugrađena jednadžba kojom bi se mogao opisati rast biomase bez izvora dušika niti je pretpostavljena autoliza biomase. Sharma i sur. (2012) su proučavali brzinu potrošnje amonijaka (izvora dušika) prilikom uzgoja *Pseudomonas putida* LS46 za proizvodnju *mcl*-PHA. Uočili su da je brzina potrošnje amonijaka iz podloge na rast brža u uvjetima limitacije rasta izvorom dušika za razliku od uvjeta u kojima je amonijak bio u suvišku. Uz povećanu brzinu potrošnje amonijaka nije se adekvatno povećala specifična brzina rasta *P. putida*. Ova se pojava kod *P. putida* LS46 može objasniti apsorpcijom amonijaka na staničnu stjenku biomase, pri čemu on u filtratu prestaje biti detektibilan, a omogućava rast tijekom faze limitacije dušikom.

Annur i sur. (2006) su također proučavali brzinu apsorpcije amonijaka iz podloge te njezin utjecaj na rast biomase bakterije *P. putida* PGA1. Prema njihovim rezultatima, kod ovoga soja se brzina apsorpcije amonijaka iz podloge usporava tijekom faze limitacije rasta biomase izvorom dušika (uz objašnjenje da se pri izrazito niskim koncentracijama amonijaka odnosno izvora dušika, zaustavlja sinteza specifičnog protein-nosača za amonijak). Uz navedeno, Annur i sur. su sukladno rezultatima zaključili da visoke koncentracije amonijaka inhibiraju rast biomase. Ovom tvrdnjom bi se mogao objasniti linearan rast biomase tijekom faze rasta kod prvog uzgoja *P. chlororaphis* i prvog uzgoja *P. citronellolis*. Treba napomenuti da tijekom provedbe uzgoja na Graz University of Technology amonijak nije dodavan prema njegovoj brzini potrošnje nego prema pH vrijednosti podloge.

No, prema rezultatima za tri uzgoja *P. chlororaphis* i dva uzgoja *P. citronellolis* vidljiv je značajan rast rezidualne biomase u vrijeme kad je koncentracija izvora N bila praktički nula. Zbog toga je eventualna adsorpcija amonijaka i naknadni rast malo vjerojatan. Naime, ako bi taj rast bio stvaran, onda bi to imalo utjecaj na kinetiku sinteze *mcl*-PHA. U tom slučaju bi veza između krivulja rasta i biosinteze *mcl*-PHA morala imati karakterističan oblik za direktnu povezanost između brzine rasta i brzine biosinteze proizvoda. To nije primijećeno ni u jednom uzgoju. Naprotiv, krivulja biosinteze *mcl*-PHA ima tipične karakteristike djelomične povezanosti između rasta i sinteze proizvoda (Luedeking –Piret model), a brzina prirasta *mcl*-PHA znatno više ukazuje na konstantnu vrijednost koncentracije rezidualne biomase u fazi biosinteze *mcl*-PHA nego na njezin rast.

Pretpostavka o autolizi biomase i njenom ponovnom rastu na vlastitom autolizatu također nema uporište obzirom da rezultati za biosintezu *mcl*-PHA ne ukazuju da postoje takve varijacije. Osim toga, autolizirana biomasa može eventualno dati jednaku količinu nove biomase, ali ne može generirati stalni i neprekidni rast, odnosno neprekidno povećanje mase. Zbog toga je eventualna adsorpcija FAME na hidrofobnu stjenku stanica i njezina gravimetrijska detekcija „pod biomasu“ vrlo izgledan događaj.

Tijekom GC-FID analize kratkolančanih monomera (*scl*-PHA) nije detektiran niti jedan monomer *scl*-PHA tipa. GC-FID analiza sastava *mcl*-PHA pokazala je da je u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 monomer s najvećim udjelom 3-hidroksioktanoat (C₈). Slijedi ga monomer 3-hidroksidekanoat (C₁₀), a zatim 3-hidroksiheksanoat (C₆), te 3-hidroksidodekanoat (C₁₂). Monomeri 3-hidroksinonenoat (C₉) i 3-hidroksiheptanoat (C₇) imaju najmanji udio. U stanicama bakterije *P. citronellolis* DSM 50332 najbrojniji monomeri u strukturi *mcl*-PHA sa gotovo izjednačenim udjelom su 3-hidroksioktanoat (C₈) i 3-hidroksidekanoat (C₁₀). Zatim slijede monomer 3-hidroksidodekanoat (C₁₂) te monomer hidroksiheksanoat (C₆). Monomeri 3-hidroksinonenoat (C₉) i 3-hidroksiheptanoat (C₇) imaju najmanji udio.

Analizom sastava izvora C (FAME) utvrđen je njegov sastav koji je prikazan u **tablici 6.**

Tablica 6. Sastav izvora ugljika (metil estera masnih kiselina), (analiza načinjena na Graz University of Technology, Austrija) (Muhr i sur., 2013a, Muhr i sur., 2013b)

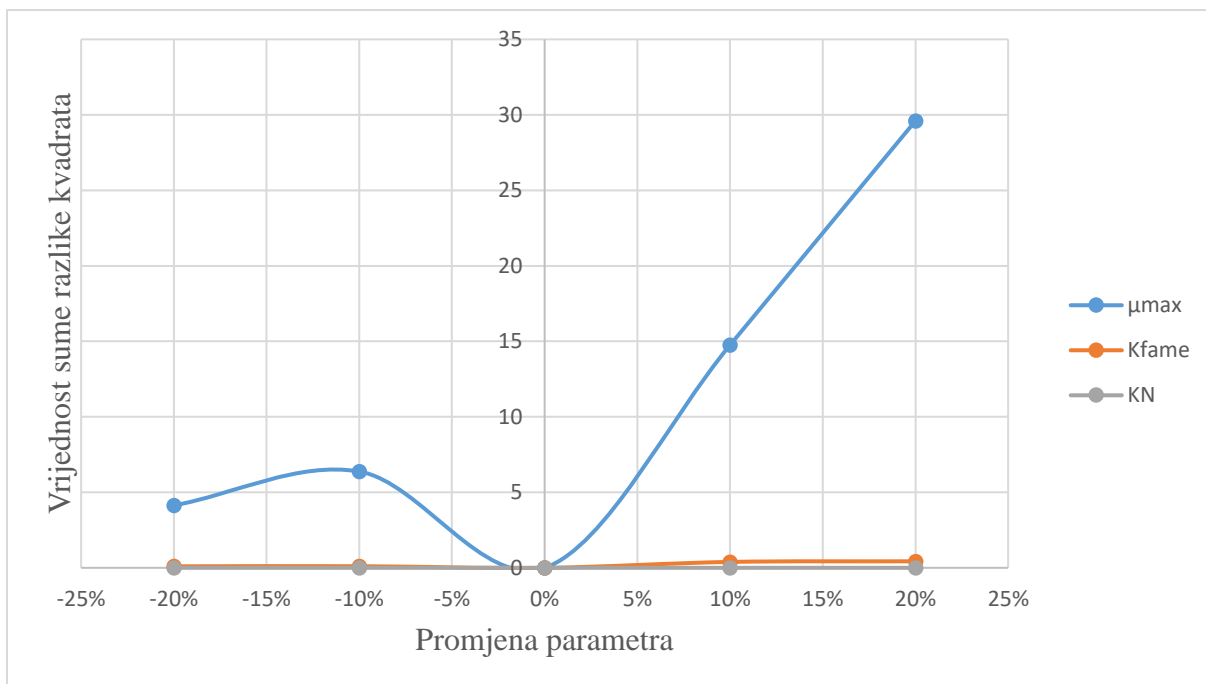
Masan kiselina	Udio [%, m/m]
Oleinska kiselina (C ₁₈)	38,5
Palmitinska kiselina (C ₁₆)	26,7
Stearinska kiselina (C ₁₈)	17,9
Linolna kiselina (C ₁₈)	4,47
Miristinska kiselina (C ₁₄)	2,79
Palmitolenska kiselina (C ₁₆)	2,63
Linolenska kiselina (C ₁₈)	0,91
Heptadekanoanska kiselina (C ₁₇)	0,65
Pentadekanoanska kiselina (C ₁₅)	0,55
Pentadekenoanska kiselina (C ₁₅)	0,21
Laurinska kiselina (C ₁₂)	0,11
Arahidinska kiselina (C ₂₀)	0,09
Gadoleinska kiselina (C ₂₀)	0,08
Neodređene kiseline	2,85

Najveći udio u FAME imaju metil esteri oleinske, palmitinske i stearinske kiseline koji sveukupno imaju udio od 83,1 %. Poznato je da raspodjela monomera u strukturi *mcl*-PHA uvelike ovisi o vrsti supstrata (Kim i sur., 2007; Fu i sur., 2014). U ovom radu, monomeri s najvećim udjelom kod oba soja su monomeri s parnim brojem ugljikovih atoma u bočnom lancu (jer su i najbrojniji metil esteri masnih kiselina upravo oni s masnim kiselinama s parnim brojem ugljikovih atoma). Fu i sur. (2014) su proveli uzgoj mikroorganizma *Pseudomonas putida* LS46 u svrhu biosinteze *mcl*-PHA. Kao izvor ugljika tijekom ovog uzgoja korištene su masene kiseline podrijetlom iz biodizela; masne kiseline s najvećim udjelom bile su C₁₈ i C₁₆ masne kiseline. Analizom strukture *mcl*-PHA u *P. putida* utvrđeno je da i ovaj mikroorganizam, kao i *P. chlororaphis*, u najvećoj mjeri nakuplja monomere 3-hidroksioktanoate (C₈).

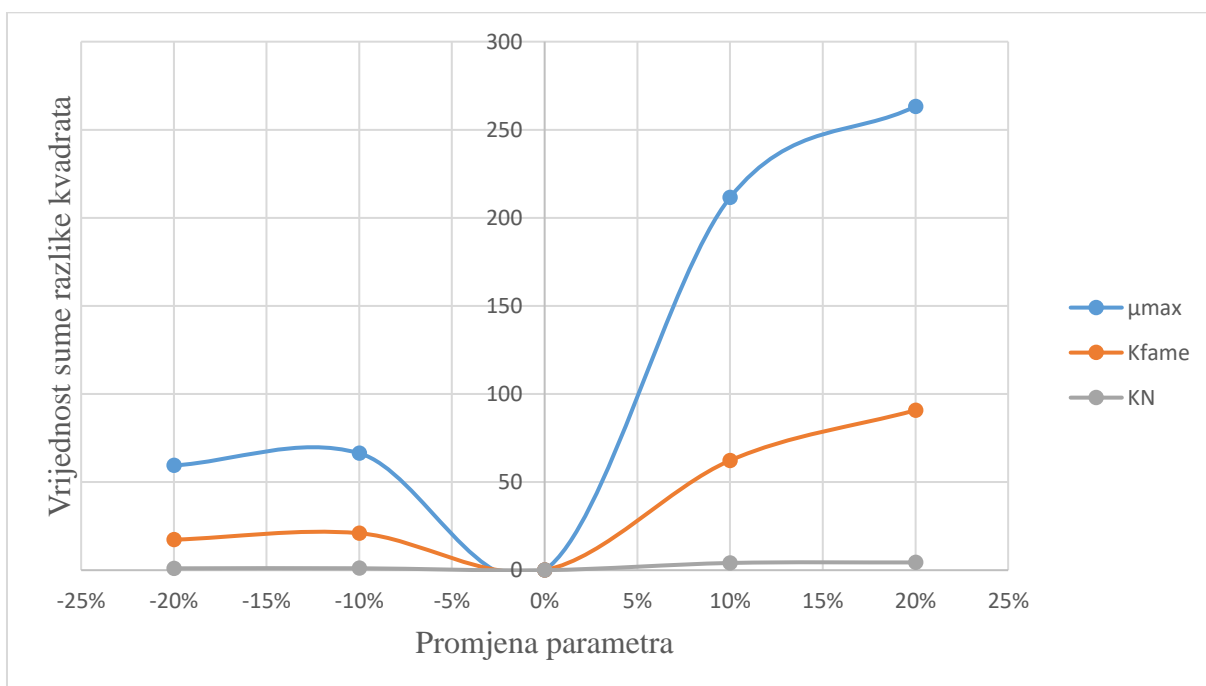
4.3. Testiranje osjetljivosti matematičkih modela biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332

Prije uporabe modela u istraživačke ili pogonske svrhe potrebno je izvršiti analizu osjetljivosti modela na promjenu parametara. Time se dobiva uvid u samu prilagodljivost matematičkog modela mogućim stvarnim situacijama u procesu (Oosterhuis i sur., 1985). Naime, glavni kriterij kvalitete matematičkog modela je njegova sposobnost „pokrivanja“ različitih procesnih uvjeta i različitih povezanih metaboličkih događaja (Horvat i sur., 2013). Ovi modeli sadrže određeni broj parametara kao i neki broj varijabli. Tome treba dodati i početne uvjete koji utječu na rezultat numeričke integracije. Zbog velikog broja parametara, testiranje osjetljivosti modela na promjenu svakog od njih bilo bi dugotrajno i neracionalno. Zbog toga je testiranje provedeno na smanjenom broju parametara. Pri tome su odabrani parametri za koje postoji saznanje da podliježu čestim promjenama ili oni za koje se očekivalo da bitno pridonose promjeni istraživanih događaja.

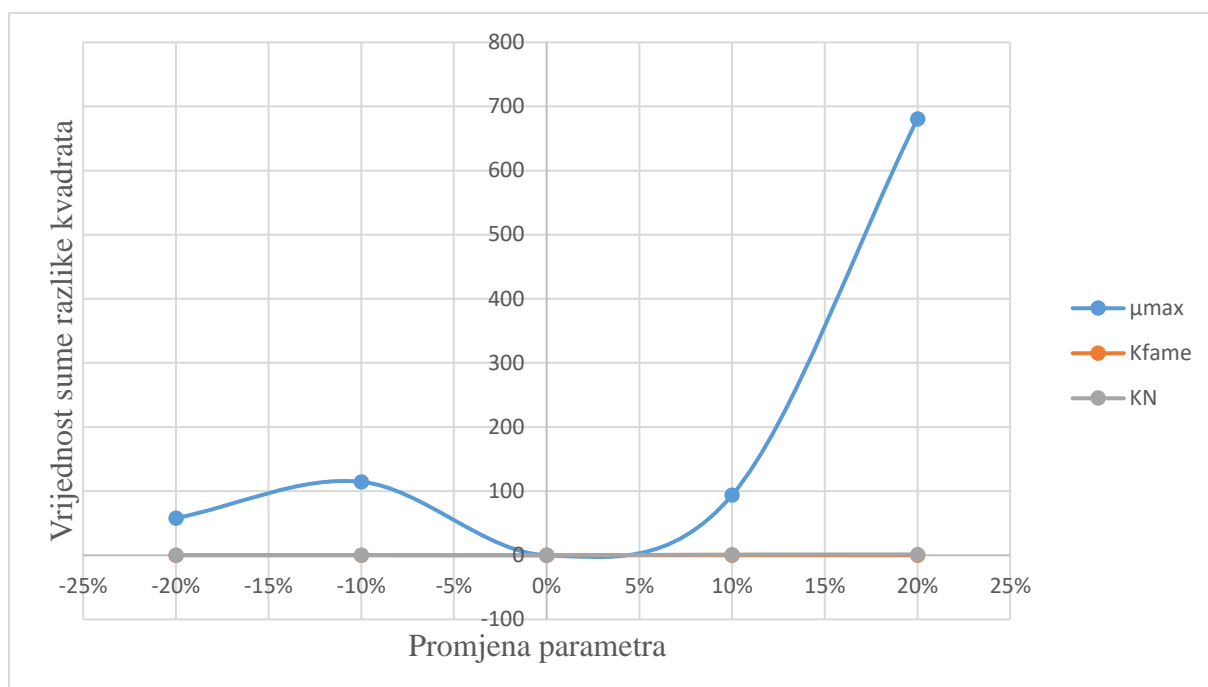
Jedan od bitnih kriterija za uspješnost matematičkog modela u ovom istraživanju bilo jest slaganje izračunatih i eksperimentalnih vrijednosti za koncentraciju rezidualne biomase kao katalitičkog dijela biomase. Zato su u ovom radu matematički modeli testirani na biokemijsko-kinetičke parametre koji utječu na brzinu rasta biomase, a to su maksimalna specifična brzina rasta, Monod-ova konstanta za FAME i Monod-ova konstanta za amonijak. Na **slikama 15 – 19** prikazani su rezultati testiranja osjetljivosti matematičkih modela na promjenu navedenih parametara. Vrijednost sume razlike kvadrata odstupanja funkcije dobivene korištenjem referentnog parametra od funkcije dobivene promjenom parametra je korištena kao kriterij koji pokazuje veličinu odstupanja matematičkog modela nakon promjene vrijednosti parametara.



Slika 15. Rezultati testiranja osjetljivosti matematičkog modela biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* (prvi uzgoja) na parametre μ_{max} , K_{fame} i K_N (referentni parametri: $\mu_{max}=0,00412 \text{ min}^{-1}$, $K_{fame}=3,953 \text{ g L}^{-1}$, $K_N=0,009 \text{ g L}^{-1}$).

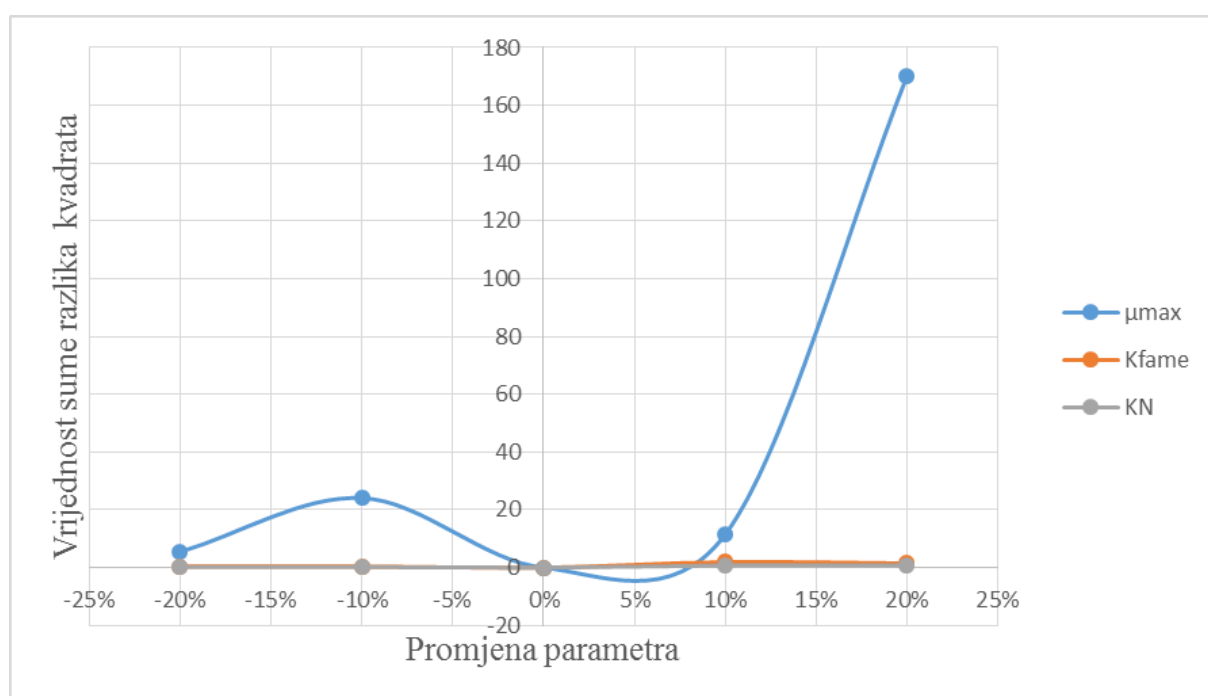


Slika 16. Rezultati testiranja osjetljivosti matematičkog modela biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* (drugi uzgoja) na parametre μ_{max} , K_{fame} i K_N (referentni parametri: $\mu_{max}=0,005 \text{ min}^{-1}$, $K_{fame}=13,6 \text{ g L}^{-1}$, $K_N=0,1 \text{ g L}^{-1}$).



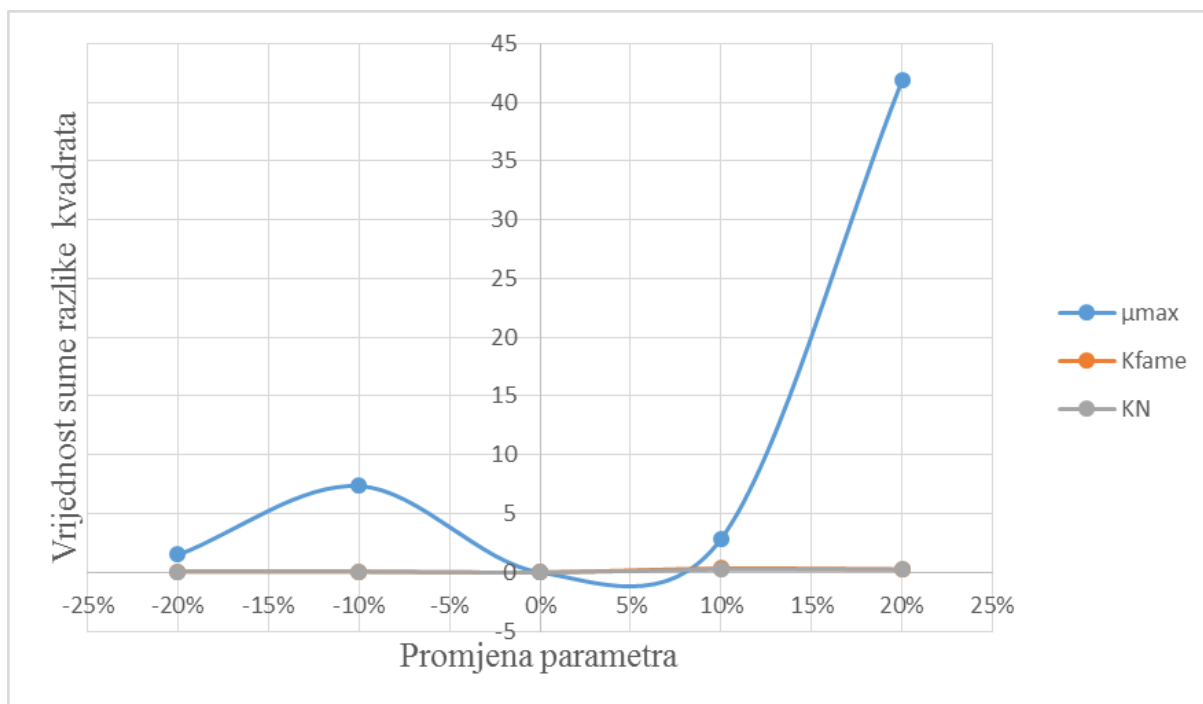
Slika 17. Rezultati testiranja osjetljivosti matematičkog modela biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* (treći uzgoja) na parametre μ_{max} , K_{fame} i K_N (referentni parametri:

$\mu_{max}=0,003407 \text{ min}^{-1}$, $K_{fame}=0,1 \text{ g L}^{-1}$, $K_N=0,05904 \text{ g L}^{-1}$).



Slika 18. Rezultati testiranja osjetljivosti matematičkog modela biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. citronellolis* (prvi uzgoja) na parametre μ_{max} , K_{fame} i K_N (referentni parametri:

$\mu_{max}=0,0037 \text{ min}^{-1}$, $K_{fame}=1,18 \text{ g L}^{-1}$, $K_N=0,05904 \text{ g L}^{-1}$).



Slika 19. Rezultati testiranja osjetljivosti matematičkog modela biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. citronellolis* (drugi uzgoja) na parametre μ_{max} , K_{fame} i K_N (referentni parametri: $\mu_{max}=0,003 \text{ min}^{-1}$, $K_{fame}=1,18 \text{ g L}^{-1}$, $K_N=0,05904 \text{ g L}^{-1}$).

Usporedbom rezultata testiranja prikazanih na **slikama 15 – 19** može se zamijetiti izrazito velika osjetljivost matematičkog modela na promjenu parametra μ_{max} . Promjena parametara K_{fame} i K_N gotovo nema utjecaj na matematički model. Povećanje parametra μ_{max} uzrokuje veću potrošnju izvora C za rast biomase pa stoga preostaje manja raspoloživa količina izvora C za biosintezu PHA. Smanjenje vrijednosti parametra μ_{max} dovodi do manjeg rasta rezidualne biomase kao „katalizatora“ biosinteze PHA – dolazi i do smanjenja brzine sinteze PHA. Smanjenom brzinom rasta biomase smanjuje se i brzina potrošnje amonijaka koji je u modelu postavljen kao inhibitor biosinteze PHA. Viša koncentracija amonijskog iona izaziva smanjenje brzine biosinteze PHA u fazi limitacije rasta izvorom dušika.

Poboljšanje produktivnosti u industrijskoj proizvodnji kao i biokemijsko-genetičkih svojstava radnih mikroorganizama zahtjeva matematičko modeliranje. Matematičkim modeliranjem moguće je vršiti optimizaciju procesa proizvodnje bez provođenja ogromnog broja eksperimenata (Novak i sur., 2015). Matematički modeli biosinteze *mcl*-PHA su pokazali dobro slaganje eksperimentalnih i izračunatih podataka (osim za rezidualnu biomasu). Potvrdili su da su *P. chlororaphis* i *P. citronellolis* mikroorganizmi kod kojih je biosinteza PHA djelomično vezana uz fazu rasta, pri čemu je to svojstvo izrazitije za *P.*

chlororaphis. Oba mikroorganizma pojačavaju biosintezu *mcl*-PHA u uvjetima ograničavanja rasta izvorom N. Ovi modeli mogu se koristiti u optimiranju biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* i *P. citronellolis*.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata matematičkog modeliranja može se zaključiti:

1. Formalno kinetički matematički modeli biosinteze *mcl*-PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332, temeljeni na Leudeking-Piret odnosu između specifičnih brzina rasta i nastajanja proizvoda (tzv. djelomična povezanost uz rast) te na višesupstratnoj Monod-ovoj ovisnosti specifične brzina rasta o koncentraciji supstrata, se djelomično slažu sa eksperimentalnim vrijednostima.
2. Neslaganje postoji za varijablu koncentracija rezidualne biomase u području ograničavanja rasta nedostatkom izvora dušika, a vidljivo je kao prisutan rast u dijelu uzgoja kad u podlozi nije bilo iskoristivog izvora N. Takav rezultat upućuje na potrebnu korekciju metode određivanja koncentracije biomase i koncentracije rezidualne biomase.
3. Potvrđeno je da su *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332 sojevi bakterija kod kojih je biosinteza PHA djelomično vezana uz fazu rasta – tijekom faze rasta biomase biosinteza PHA se odvija pri mnogo manjoj specifičnoj brzini sinteze nego u fazi limitacije rasta izvorom dušika.
4. Biosinteza PHA u stanicama *P. citronellolis* DSM 50332 je u fazi rasta biomase tako slaba da se ta bakterija može svrstati u grupu koju karakterizira sinteza PHA tek poslije izazivanja ograničenja rasta nedostatkom izvora N ili P.
5. Pošto je značajan rast biomase uočen tijekom limitacije rasta izvorom dušika, potrebno je dodatno istražiti utjecaj izvora dušika i izvora C (amonijaka i FAME) na rast navedenih sojeva (tj. provjeriti moguću adsorpciju na biomasu).
6. Testiranjem osjetljivost matematičkih modela na promjenu biokemijsko-kinetičkih parametara nađena je izrazita osjetljivost modela na promjenu parametra maksimalna specifična brzina rasta (μ_{max}).
7. *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332 smatraju se obećavajućim mikroorganizmima u proizvodnji *mcl*-PHA iz otpadnih metil estara viših masnih kiselina iz proizvodnje biodizela (FAME), iako vrlo niske specifične brzine rasta na tom supstratu zahtijevaju daljnja istraživanja na njihovom povećanju.

6. LITERATURA

Andričić, B. (2009) *Prirodni polimerni materijali*, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Split.

Annuar, M.S.M., Tan, I.K.P., Ibrahim, S., Ramachandran, K.B. (2008) A kinetic model for growth and biosynthesis of medium-chain-length poly-(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas putida*. *Braz. J. Chem. Eng.* **25**, 217 – 228.

Annuar, M.S.M., Tan, I.K.P., Ibrahim, S., Ramachandran, K.B. (2006) Ammonium uptake and growth kinetics of *Pseudomonas putida* PGA1. *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* **14**, 1 – 10.

Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., Alvarez, V. (2014) Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polym. Lett.* **8**, 791 – 808.

Burden, R.L., Faires, J.D. (2011) *Numerical Analysis*, 9.izd., Cengage Learning, Boston.

CEN/TR 15932:2010, Plastics — Recommendation for terminology and characterisation of biopolymers and bioplastics.

Chee, J.Y., Yoga, S.S., Lau, N.S., Ling, S.C., Abed, R.M.M., Sudesh, K. (2010) Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting renewable resources into bioplastics. U: *Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2. izd. (Méndez-Vilas, A., ured.), Formatex, Badajoz, str. 1395 – 1404.

Du, C., Sabirova, J., Soetaert, W., Lin, S.K.C. (2012) Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials. *Curr. Chem. Biol.* **6**, 14 – 25.

Dunn, I.J., Heinzle, E., Ingham, J., Přenosil, J.E. (2003) *Biological Reaction Engineering*, 2. izd., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Fu, J., Sharma, U., Sparling, R., Cicek, N., Levin, D.B. (2014) Evaluation of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas putida* LS46 using biodiesel by-product streams. *Can. J. Microbiol.* **60**, 461 – 468.

Gierisch, C. (2000) Mathematical modelling of metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 249 – 253.

Heinzle, E., Lafferty, R.M. (1980) A kinetic model for growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H 16. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 8 – 16.

Horvat, P., Koller, M., Braunegg, G., (2016) Kinetic aspects and mathematical modeling of PHA biosynthesis. U: *Recent Advances in Biotechnology – Microbial Biopolyester Production, Performance and Processing. Bioengineering, Characterization, and Sustainability*, 2. izd. (Koller, M. ured.), Bentham Science Publishers, Sharajh, str. 111 – 214.

Horvat, P., Vrana Špoljarić, I., Lopar, M., Atlić, A., Koller, M., Braunegg, G. (2013) Mathematical modelling and process optimization of a continuous 5-stage bioreactor cascade for production of poly[-(R)-3-hydroxybutyrate] by *Cupriavidus necator*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36**, 1235 – 1250.

Khanna, S., Srivastava, A.K. (2005) Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem.* **40**, 607 – 619.

Kim, D.Y., Kim, H.W., Chung, M.G., Rhee, Y.H. (2007) Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *J. Microbiol.* **45**, 87 – 97.

Koller M., Salerno A., Muhr A., Reiterer A., Chiellini E., Casella S., Horvat P., Braunegg G. (2012) Whey lactose as a raw material for microbial production of biodegradable polyesters. U: *Polyester* (Saleh, H.E.D.M., ured.), InTech, Rijeka, str. 51 – 92.

Koller, M. (2014) Poly(hydroxyalkanoates) for food packaging: Application and attempts towards implementation. *Appl. Food Biotechnol.* **1**, 3 – 15.

Koller, M., Muhr, A. (2014) Continuous production mode as a viable process-engineering tool for efficient poly(hydroxyalkanoate) (PHA) bio-production. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **28**, 65 – 77.

Kunasundari, B., Sudesh, K. (2011) Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express. Polym. Lett.* **5**, 620 – 634.

Kurtanjek, Ž. (2003) *Matematičko modeliranje i vođenje procesa*, Interna skripta PBF, Zagreb.

Lu, J., Tappel, R.C., Nomura, C.T. (2009) Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). *Polym. Rev.* **49**, 226 – 248.

- Luedeking, R., Piret, E.L. (1959) A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol.* **1**, 393 – 412.
- Macey, R.I., Oster, G.F. (2016) Berkeley Madonna. University of California, Department of Molecular and Cellular Biology, Berkeley, California, <<https://www.berkeleymadonna.com/>> . Pristupljenio 1. lipnja 2017.
- Marsudi S. (2006) Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from bacterial cells using enzymatic process. *Reaktor* **10**, 59 – 62.
- McGee, R.D., Drake, J.F., Fredrickson, A.G. and Tsuchiya, H.M. (1972) Studies in intermicrobial symbiosis, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus casei*. *Can. J. Microbiol.* **18**, 1733-1742.
- Monod, J. (1942) *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Hermann & cie, Paris.
- Muhr, A., Rechberger, E.M., Salerno, A., Reiterer, A., Malli, K., Strohmeier, K., Schober, S., Mittelbach, M., Koller, M. (2013a) Novel description of *mcl*-PHA biosynthesis by *Pseudomonas chlororaphis* from animal-derived waste. *J. Biotechnol.* **165**, 45 – 51.
- Muhr, A., Rechberger, E.M., Salerno, A., Reiterer, A., Schiller, M., Kwiecień, M., Adamus, G., Kowalczyk, M., Strohmeier, K., Schober, S., Mittelbach, M., Koller, M. (2013b) Biodegradable latexes from animal-derived waste: Biosynthesis and characterization of *mcl*-PHA accumulated by *Ps. citronellolis*. *React. Funct. Polym.* **73**, 1391 – 1398.
- Novak, M., Koller, M., Braunegg, G., Horvata, P. (2015) Mathematical modelling as a tool for optimized PHA production. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **29**, 183 – 220.
- Oosterhuis, N.M.G., Kossen, N.W.F., Olivier, A.P.C., Schen, E.S. (1985) Scale-down and optimization studies of the gluconic acid fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 711 – 720.
- Park, J., Lakes, R.S. (2007) *Biomaterials. An Introduction* [online], 3. izd, Springer Science i Business Media LLC, New York.
- Patnaik, P.R. (2005) Perspectives in the modeling and optimization of PHB production by pure and mixed cultures. *Crit. Rev. Biotechnol.* **25**, 153 – 171.

- Peelman, N., Ragaert, P., Ragaert, K., De Meulenaer, B., Devlieghere, F., Cardon, L. (2015) Heat resistance of new biobased polymeric materials, focusing on starch, cellulose, PLA, and PHA. *J. Appl. Polym. Sci.* **132**, 42305 – 42320.
- Rochow, T.G., Rochow, E.G. (1976) *Resinography: An Introduction to the Definition, Identification, and Recognition of Resins, Polymers, Plastics, and Fibers*, Plenum Press, New York.
- Sharma, P.K., Fu, J., Cicek, N., Sparling, R., Levin, D.B. (2012) Kinetics of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production by a novel isolate of *Pseudomonas putida* LS46. *Can. J. Microbiol.* **58**, 982 – 989.
- Sun, Z., Ramsay, J.A., Guay, M., Ramsay, B.A. (2007) Fermentation process development for the production of medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Appl. Microbiol. Biot.* **75**, 475 – 485.
- Wei, Y.H., Chen, W.C., Wu, H.S., Janarthanan, O.M. (2011) Biodegradable and biocompatible biomaterial, polyhydroxybutyrate, produced by an indigenous *Vibrio* sp. BM-1 isolated from marine environment. *Mar. Drugs* **9**, 615 – 624.
- Yoo, S., Kim, W.S. (1994) Cybernetic model for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 1043 – 1051.

7. PRILOZI

7.1. Tumač kratica, oznaka, fizikalno-kemijskih veličina i varijabli korištenih u matematičkim modelima biosinteze PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 i *P. citronellolis* DSM 50332 u računalnom programu Berkeley Madonna

METHOD RK4 - numerička metoda integracije, Runge-Kutta (4. stupnja)

STARTTIME – početno vrijeme simulacije [min]

STOPTIME – konačno vrijeme simulacije [min]

DT – korak numeričke integracije [min]

MCDM – masa ukupne suhe tvari biomase [g]

CDM – koncentracija ukupne suhe tvari biomase [g L^{-1}]

MXr – masa rezidualne biomase prisutna u podlozi [g]

Xr – koncentracija rezidualne biomase u podlozi [g L^{-1}]

MPHA – masa PHA prisutna u podlozi [g]

PHA – koncentracija PHA u podlozi [g L^{-1}]

MFAME – masa FAME prisutna u podlozi [g]

FAME – koncentracija FAME u podlozi [g L^{-1}]

MNH4 – masa NH4 prisutna u podlozi [g]

NH4 – koncentracija NH4 u podlozi [g L^{-1}]

O2 – koncentracija otopljenog kisika u podlozi [g L^{-1}]

V – volumen podloge [L]

mi1 – specifična brzina rasta (μ) [min^{-1}]

mi1max – maksimalna specifična brzina rasta (μ_{max}) [min^{-1}]

Kfame – Monod-ova konstanta (zasićenja) za FAME [g L^{-1}]

KN – Monod-ova konstanta (zasićenja) za amonijak [g L^{-1}]

KO2 – Monod-ova konstanta (zasićenja) za otopljeni kisik [g L^{-1}]

q – specifična brzina biosinteze PHA [$\text{g g}^{-1} \text{min}^{-1}$]

qmax – maksimalna specifična brzina biosinteze PHA [$\text{g g}^{-1} \text{min}^{-1}$]

KiNH4 – konstanta inhibicije biosinteze PHA amonijakom [g L^{-1}]

C6 – koncentracija 3-hidroksiheksanoata [g L^{-1}]

C7 – koncentracija 3-hidroksiheptanoata [g L^{-1}]

C8 – koncentracija 3-hidroksioktanoata [g L^{-1}]

C9 – koncentracija 3-hidroksinonenoata [g L^{-1}]

C10 – koncentracije 3-hidroksidekanoata [g L^{-1}]

C12 – koncentracija 3-hidroksidodekanoata [g L^{-1}]

FC6 – udio 3-hidroksiheksanoata u strukturi *mcl*-PHA [g g^{-1}]

FC7 – udio 3-hidroksiheptanoata u strukturi *mcl*-PHA [g g^{-1}]

FC8 – udio 3-hidroksioktanoata u strukturi *mcl*-PHA [g g^{-1}]

FC9 – udio 3-hidroksinonenoata u strukturi *mcl*-PHA [g g^{-1}]

FC10 – udio 3-hidroksidekanoata u strukturi *mcl*-PHA [g g^{-1}]

FC12 – udio 3-hidroksidodekanoata u strukturi *mcl*-PHA [g g^{-1}]

Y3 – koeficijent prinosa rezidualne biomase na izvor C ($Y_{Xr/FAME}$) [g Xr/g FAME]

Y4 – koeficijent prinosa PHA obzirom na rezidualnu biomasu ($Y_{PHA/Xr}$) [g PHA/g Xr]

Y5 – koeficijent prinosa PHA na izvor C ($Y_{PHA/FAME}$) [g PHA/g FAME]

Y7 – koeficijent prinosa rezidualne biomase na izvor dušika (Y_{Xr/NH_4}) [g Xr/g NH_4^+]

squarepulse (a; b) – skokovita impulsna promjena varijable u momentu (vremenu) „a“ i trajanja „b“

7.2. Program za matematičko modeliranje (simulaciju uzgoja) biosinteze PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 – prvi uzgoj

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME = 2941

DT = 0,02

Masa ukupne suhe tvari biomase:

$MCDM = MXr + MPHA$

Koncentracija suhe tvari biomase:

$CDM = MCDM/V$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu rezidualne biomase (X_r):

$$\begin{aligned} d/dt(MXr) = & B - \text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(720; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(900; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(1080; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(1260; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(1440; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(1620; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(1800; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(1980; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(2160; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(2520; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(2880; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(2940; 1)*0,07*Xr \end{aligned}$$

$B = \text{if time} < 720 \text{ then } 0,00446 \text{ else } mi1 * MXr$

Specifična brzina rasta:

$mi1 = mi1max * (FAME / (Kfame + FAME)) * (NH4 / (KN + NH4))$

Koncentracija rezidualne biomase:

$Xr = MXr / V$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu PHA:

$d/dt(MPHA) = P - \text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(720; 1)*0,07*PHA$

$-\text{squarepulse}(900; 1)*0,07*\text{PHA}$ $-\text{squarepulse}(1080; 1)*0,07*\text{PHA}$
 $-\text{squarepulse}(1260; 1)*0,07*\text{PHA}$ $-\text{squarepulse}(1440; 1)*0,07*\text{PHA}$
 $-\text{squarepulse}(1620; 1)*0,07*\text{PHA}$ $-\text{squarepulse}(1800; 1)*0,07*\text{PHA}$
 $-\text{squarepulse}(1980; 1)*0,07*\text{PHA}$ $-\text{squarepulse}(2160; 1)*0,07*\text{PHA}$
 $-\text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*\text{PHA}$ $-\text{squarepulse}(2520; 1)*0,07*\text{PHA}$
 $-\text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*\text{PHA}$ $-\text{squarepulse}(2880; 1)*0,07*\text{PHA}$
 $-\text{squarepulse}(2940; 1)*0,07*\text{PHA}$

$P = \text{if time} < 720 \text{ then } 0 \text{ else } (q*\text{MXr}) + B*Y4$

Koncentracija PHA (obzirom na volumen podloge):

$\text{PHA} = \text{MPHA}/V$

Diferencijalna jednadžba bilance mase za varijablu masa amonijaka:

$d/dt(\text{MNH}_4) = \text{if time} < 720 \text{ then } (\text{squarepulse}(360; 1)*2,933$

$-\text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07*\text{NH}_4) \text{ else } (-\text{mi}1*\text{MXr}/Y7$
 $+\text{squarepulse}(810; 1)*0,894 + \text{squarepulse}(990; 1)*0,573$
 $+\text{squarepulse}(1170; 1)*0,663 + \text{squarepulse}(1350; 1)*0,4$
 $+\text{squarepulse}(1530; 1)*2$
 $-\text{squarepulse}(720; 1)*0,07*\text{NH}_4$ $-\text{squarepulse}(900; 1)*0,07*\text{NH}_4$
 $-\text{squarepulse}(1080; 1)*0,07*\text{NH}_4$ $-\text{squarepulse}(1260; 1)*0,07*\text{NH}_4$
 $-\text{squarepulse}(1440; 1)*0,07*\text{NH}_4$ $-\text{squarepulse}(1620; 1)*0,07*\text{NH}_4$
 $-\text{squarepulse}(1800; 1)*0,07*\text{NH}_4$ $-\text{squarepulse}(1980; 1)*0,07*\text{NH}_4$
 $-\text{squarepulse}(2160; 1)*0,07*\text{NH}_4$ $-\text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*\text{NH}_4$
 $-\text{squarepulse}(2520; 1)*0,07*\text{NH}_4$ $-\text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*\text{NH}_4$
 $-\text{squarepulse}(2880; 1)*0,07*\text{NH}_4$ $-\text{squarepulse}(2940; 1)*0,07*\text{NH}_4)$

Koncentracija amonijaka:

$\text{NH}_4 = \text{MNH}_4/V$

Diferencijalna jednadžba bilance mase za varijablu masa izvora C (FAME):

$$d/dt(MFAME) = \text{if time} < 720 \text{ then } (-0,00446/Y3) \text{ else } ((-q*MXr)/Y5) -mi1*MXr/Y3$$

$$\begin{aligned} & -\text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07*FAME +\text{squarepulse}(720; 1)*10,2 \\ & +\text{squarepulse}(1080; 1)*10 +\text{squarepulse}(1440; 1)*10 \\ & +\text{squarepulse}(1800; 1)*10,2 +\text{squarepulse}(2160; 1)*10 \\ & +\text{squarepulse}(2520; 1)*10,1 +\text{squarepulse}(2700; 1)*5 \\ & -\text{squarepulse}(720; 1)*0,07*FAME -\text{squarepulse}(900; 1)*0,07*FAME \\ & -\text{squarepulse}(1080; 1)*0,07*FAME -\text{squarepulse}(1260; 1)*0,07*FAME \\ & -\text{squarepulse}(1440; 1)*0,07*FAME -\text{squarepulse}(1620; 1)*0,07*FAME \\ & -\text{squarepulse}(1800; 1)*0,07*FAME -\text{squarepulse}(1980; 1)*0,07*FAME \\ & -\text{squarepulse}(2160; 1)*0,07*FAME -\text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*FAME \\ & -\text{squarepulse}(2520; 1)*0,07*FAME -\text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*FAME \\ & -\text{squarepulse}(2880; 1)*0,07*FAME -\text{squarepulse}(2940; 1)*0,07*FAME \end{aligned}$$

Koncentracija izvora C (FAME):

$$FAME = MFAME/V$$

Diferencijalna jednačba za promjenu volumena podloge u reaktoru:

$$\begin{aligned} d/dt(V) = & +\text{squarepulse}(0,2; 1)*0,0117 +\text{squarepulse}(720; 1)*0,0119 \\ & +\text{squarepulse}(1080; 1)*0,0117 +\text{squarepulse}(1440; 1)*0,0117 \\ & +\text{squarepulse}(1800; 1)*0,0119 +\text{squarepulse}(2160; 1)*0,0117 \\ & +\text{squarepulse}(2520; 1)*0,0118 +\text{squarepulse}(2700; 1)*0,0058 \\ & +\text{squarepulse}(360; 1)*0,003223 +\text{squarepulse}(810; 1)*0,000982 \\ & +\text{squarepulse}(990; 1)*0,00063 +\text{squarepulse}(1170; 1)*0,000728 \\ & +\text{squarepulse}(1350; 1)*0,000318 +\text{squarepulse}(1530; 1)*0,001392 \\ & -\text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(720; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(900; 1)*0,07 \\ & -\text{squarepulse}(1080; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(1260; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(1440; 1)*0,07 \\ & -\text{squarepulse}(1620; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(1800; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(1980; 1)*0,07 \\ & -\text{squarepulse}(2160; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(2340; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(2520; 1)*0,07 \end{aligned}$$

$$-\text{squarepulse}(2700; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(2880; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(2940; 1)*0,07$$

Koncentracije *mcl*-PHA ($C_6 - C_{12}$ frakcije):

$$C_6 = \text{PHA} * \text{FC}_6$$

$$C_7 = \text{PHA} * \text{FC}_7$$

$$C_8 = \text{PHA} * \text{FC}_8$$

$$C_9 = \text{PHA} * \text{FC}_9$$

$$C_{10} = \text{PHA} * \text{FC}_{10}$$

$$C_{12} = \text{PHA} * \text{FC}_{12}$$

Udjeli $C_6 - C_{12}$ monomera u *mcl*-PHA:

$$\text{FC}_6 = 0,147$$

$$\text{FC}_7 = 0,0116$$

$$\text{FC}_8 = 0,484$$

$$\text{FC}_9 = 0,0177$$

$$\text{FC}_{10} = 0,2475$$

$$\text{FC}_{12} = 0,0479$$

Početni uvjeti:

$$\text{INIT MXr} = 2,5843$$

$$\text{INIT MNH}_4 = 2,40905$$

$$\text{INIT MPHA} = 0,2093$$

$$\text{INIT V} = 2$$

$$\text{INIT MFAME} = 10$$

Specifična brzina sinteze PHA:

$$q = q_{\max} * (\text{FAME} / (\text{Kfame} + \text{FAME})) * (\text{KiNH}_4 / (\text{KiNH}_4 + \text{NH}_4))$$

Kinetičke konstante:

$$mi1_{\max} = 0,00412$$

$$\text{Kfame} = 3,953$$

$$KN = 0,009$$

$$q_{max} = 0,0006232$$

$$K_{iNH4} = 19,94$$

Koeficijenti prinosa:

$$Y_3 = 1,141$$

$$Y_4 = 0,01$$

$$Y_5 = 0,169$$

$$Y_7 = 4,77$$

7.3. Program za matematičko modeliranje (simulaciju uzgoja) biosinteze PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 – drugi uzgoj

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME = 2341

DT = 0,02

Masa ukupne suhe tvari biomase:

$$M_{CDM} = M_{Xr} + M_{PHA}$$

Koncentracija suhe tvari biomase:

$$CDM = M_{CDM}/V$$

Diferencijalna jednadžba bilance mase za varijablu rezidualne biomase (X_r):

$$\begin{aligned} d/dt(M_{Xr}) = & B - \text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07*X_r - \text{squarepulse}(900; 1)*0,07*X_r \\ & - \text{squarepulse}(1140; 1)*0,07*X_r - \text{squarepulse}(1380; 1)*0,07*X_r \\ & - \text{squarepulse}(1620; 1)*0,07*X_r - \text{squarepulse}(1860; 1)*0,07*X_r \\ & - \text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*X_r \end{aligned}$$

$$B = \mu_{l1} * M_{Xr}$$

Specifična brzina rasta:

$$\mu_{l1} = \mu_{l1max} * (FAME / (K_{fame} + FAME)) * (NH_4 / (K_N + NH_4))$$

Koncentracija rezidualne biomase:

$$X_r = M_{X_r}/V$$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu PHA:

$$\begin{aligned} d/dt(M_{PHA}) = & P \cdot \text{squarepulse}(0,2; 1) \cdot 0,07 \cdot PHA - \text{squarepulse}(900; 1) \cdot 0,07 \cdot PHA \\ & - \text{squarepulse}(1140; 1) \cdot 0,07 \cdot PHA - \text{squarepulse}(1380; 1) \cdot 0,07 \cdot PHA \\ & - \text{squarepulse}(1620; 1) \cdot 0,07 \cdot PHA - \text{squarepulse}(1860; 1) \cdot 0,07 \cdot PHA \\ & - \text{squarepulse}(2340; 1) \cdot 0,07 \cdot PHA \end{aligned}$$

$$P = B \cdot Y_4 + q \cdot M_{X_r}$$

Koncentracija PHA (obzirom na volumen podloge):

$$PHA = M_{PHA}/V$$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu masa amonijaka:

$$d/dt(M_{NH_4}) = \text{if time} < 1380 \text{ then } 0 \text{ else } (-m_{i1} \cdot M_{X_r}/Y_7)$$

Koncentracija amonijaka:

$$NH_4 = M_{NH_4}/V$$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu masa izvora C (FAME):

$$\begin{aligned} d/dt(M_{FAME}) = & (-m_{i1} \cdot M_{X_r}/Y_3) - (q \cdot M_{X_r})/Y_5 + \text{squarepulse}(900; 1) \cdot 37,6 \\ & + \text{squarepulse}(1140; 1) \cdot 37,8 + \text{squarepulse}(1380; 1) \cdot 50 \\ & + \text{squarepulse}(1620; 1) \cdot 50,2 + \text{squarepulse}(1860; 1) \cdot 50 \\ & - \text{squarepulse}(0,2; 1) \cdot 0,07 \cdot FAME - \text{squarepulse}(900; 1) \cdot 0,07 \cdot FAME \\ & - \text{squarepulse}(1140; 1) \cdot 0,07 \cdot FAME - \text{squarepulse}(1380; 1) \cdot 0,07 \cdot FAME \\ & - \text{squarepulse}(1620; 1) \cdot 0,07 \cdot FAME - \text{squarepulse}(1860; 1) \cdot 0,07 \cdot FAME \\ & - \text{squarepulse}(2340; 1) \cdot 0,07 \cdot FAME \end{aligned}$$

Koncentracija izvora C (FAME):

$$FAME = M_{FAME}/V$$

Diferencijalna jednačba za promjenu volumena podloge u reaktoru:

$$d/dt(V) = \text{squarepulse}(900; 1) \cdot 0,0439 + \text{squarepulse}(1140; 1) \cdot 0,0441$$

$+squarepulse(1380; 1)*0,0584 +squarepulse(1620; 1)*0,0586$
 $+squarepulse(1860; 1)*0,0584$
 $-squarepulse(0,2; 1)*0,07 -squarepulse(900; 1)*0,07 -squarepulse(1140; 1)*0,07$
 $-squarepulse(1380; 1)*0,07 -squarepulse(1620; 1)*0,07 -squarepulse(1860; 1)*0,07$
 $-squarepulse(2340; 1)*0,07$

Koncentracije *mcl*-PHA (C₆ – C₁₂ frakcije):

$$C_6 = PHA * FC_6$$

$$C_7 = PHA * FC_7$$

$$C_8 = PHA * FC_8$$

$$C_9 = PHA * FC_9$$

$$C_{10} = PHA * FC_{10}$$

$$C_{12} = PHA * FC_{12}$$

Udjeli C₆ – C₁₂ monomera u *mcl*-PHA:

$$FC_6 = 0,129$$

$$FC_7 = 0,0273$$

$$FC_8 = 0,425$$

$$FC_9 = 0,055$$

$$FC_{10} = 0,2631$$

$$FC_{12} = 0,0636$$

Početni uvejti:

$$INIT\ MXr = 13,6655$$

$$INIT\ MNH_4 = 3,33$$

$$INIT\ MPHA = 2,385$$

$$INIT\ V = 5$$

$$INIT\ MFAME = 50$$

Specifična brzina sinteze PHA:

$$q = q_{\max} \cdot (FAME / (K_{fame} + FAME)) \cdot (K_{iNH_4} / (K_{iNH_4} + NH_4))$$

Kinetičke konstante:

$$m_{l\max} = 0,005$$

$$K_{fame} = 13,6$$

$$K_N = 0,1$$

$$q_{\max} = 0,0001959$$

$$K_{iNH_4} = 0,2474$$

Koeficijenti prinosa:

$$Y_3 = 1,9998$$

$$Y_4 = 0,028$$

$$Y_5 = 0,08434$$

$$Y_7 = 5,2034$$

7.4. Program za matematičko modeliranje (simulaciju uzgoja) biosinteze PHA u stanicama *P. chlororaphis* DSM 50083 – treći uzgoje

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME = 2761

DT = 0,02

Masa ukupne suhe tvari biomase:

$$M_{CDM} = M_{Xr} + M_{PHA}$$

Koncentracija suhe tvari biomase:

$$CDM = M_{CDM} / V$$

Diferencijalna jednačina bilance mase za varijablu rezidualne biomase (X_r):

$$\begin{aligned} d/dt(M_{Xr}) = & B \cdot \text{squarepulse}(0,2; 1) \cdot 0,07 \cdot X_r - \text{squarepulse}(180; 1) \cdot 0,07 \cdot X_r \\ & - \text{squarepulse}(360; 1) \cdot 0,07 \cdot X_r - \text{squarepulse}(540; 1) \cdot 0,07 \cdot X_r \\ & - \text{squarepulse}(720; 1) \cdot 0,07 \cdot X_r - \text{squarepulse}(900; 1) \cdot 0,07 \cdot X_r \end{aligned}$$

$-\text{squarepulse}(1080; 1)*0,07*Xr -\text{squarepulse}(1260; 1)*0,07*Xr$
 $-\text{squarepulse}(1440; 1)*0,07*Xr -\text{squarepulse}(1620; 1)*0,07*Xr$
 $-\text{squarepulse}(1800; 1)*0,07*Xr -\text{squarepulse}(1980; 1)*0,07*Xr$
 $-\text{squarepulse}(2160; 1)*0,07*Xr -\text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*Xr$
 $-\text{squarepulse}(2520; 1)*0,07*Xr -\text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*Xr$
 $-\text{squarepulse}(2760; 1)*0,07*Xr$

$$B = m_{il} * MXr$$

Specifična brzina rasta:

$$m_{il} = m_{ilmax} * (FAME / (K_{fame} + FAME)) * (NH_4 / (K_N + NH_4))$$

Koncentracija rezidualne biomase:

$$Xr = MXr / V$$

Diferencijalna jednačina bilance mase za varijablu PHA:

$$\begin{aligned}
 d/dt(MPHA) = & P - \text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(180; 1)*0,07*PHA \\
 & - \text{squarepulse}(360; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(540; 1)*0,07*PHA \\
 & - \text{squarepulse}(720; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(900; 1)*0,07*PHA \\
 & - \text{squarepulse}(1080; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(1260; 1)*0,07*PHA \\
 & - \text{squarepulse}(1440; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(1620; 1)*0,07*PHA \\
 & - \text{squarepulse}(1800; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(1980; 1)*0,07*PHA \\
 & - \text{squarepulse}(2160; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*PHA \\
 & - \text{squarepulse}(2520; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*PHA \\
 & - \text{squarepulse}(2760; 1)*0,07*PHA
 \end{aligned}$$

$$P = B * Y_4 + q * MXr$$

Koncentracija PHA (obzirom na volumen podloge):

$$PHA = MPHA / V$$

Diferencijalna jednačina bilance mase za varijablu masu amonijaka:

$$d/dt(MNH_4) = -m_{il} * MXr / Y_7 + \text{squarepulse}(180; 1)*1,8 + \text{squarepulse}(360; 1)*1,1$$

$$\begin{aligned}
& +\text{squarepulse}(540; 1)*3,35 +\text{squarepulse}(720; 1)*3,7 \\
& +\text{squarepulse}(900; 1)*7,2 +\text{squarepulse}(1080; 1)*4,5 \\
& +\text{squarepulse}(1260; 1)*7 \\
& -\text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07* \text{NH}_4 -\text{squarepulse}(180; 1)*0,07* \text{NH}_4 \\
& -\text{squarepulse}(360; 1)*0,07* \text{NH}_4 -\text{squarepulse}(540; 1)*0,07* \text{NH}_4 \\
& -\text{squarepulse}(720; 1)*0,07* \text{NH}_4 -\text{squarepulse}(900; 1)*0,07* \text{NH}_4 \\
& -\text{squarepulse}(1080; 1)*0,07* \text{NH}_4 -\text{squarepulse}(1260; 1)*0,07* \text{NH}_4 \\
& -\text{squarepulse}(1440; 1)*0,07* \text{NH}_4 -\text{squarepulse}(1620; 1)*0,07* \text{NH}_4 \\
& -\text{squarepulse}(1800; 1)*0,07* \text{NH}_4 -\text{squarepulse}(1980; 1)*0,07* \text{NH}_4 \\
& -\text{squarepulse}(2160; 1)*0,07* \text{NH}_4 -\text{squarepulse}(2340; 1)*0,07* \text{NH}_4 \\
& -\text{squarepulse}(2520; 1)*0,07* \text{NH}_4 -\text{squarepulse}(2700; 1)*0,07* \text{NH}_4 \\
& -\text{squarepulse}(2760; 1)*0,07* \text{NH}_4
\end{aligned}$$

Koncentracija amonijaka:

$$\text{NH}_4 = \text{MNH}_4/\text{V}$$

Diferencijalna jednačina bilance mase za varijablu masa izvora C (FAME):

$$\begin{aligned}
d/dt(\text{MFAME}) = & ((-q*\text{MXr})/\text{Y}_5) -(\text{mi1}*\text{MXr})/\text{Y}_3 +\text{squarepulse}(360; 1)*50,1 \\
& +\text{squarepulse}(540; 1)*25 +\text{squarepulse}(720; 1)*25,1 \\
& +\text{squarepulse}(900; 1)*50 +\text{squarepulse}(1260; 1)*50,2 \\
& +\text{squarepulse}(1800; 1)*50+\text{squarepulse}(2340; 1)*50,1 \\
& -\text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07*\text{FAME} -\text{squarepulse}(180; 1)*0,07* \text{FAME} \\
& -\text{squarepulse}(360; 1)*0,07* \text{FAME} -\text{squarepulse}(540; 1)*0,07* \text{FAME} \\
& -\text{squarepulse}(720; 1)*0,07* \text{FAME} -\text{squarepulse}(900; 1)*0,07* \text{FAME} \\
& -\text{squarepulse}(1080; 1)*0,07* \text{FAME} -\text{squarepulse}(1260; 1)*0,07* \text{FAME} \\
& -\text{squarepulse}(1440; 1)*0,07* \text{FAME} -\text{squarepulse}(1620; 1)*0,07* \text{FAME} \\
& -\text{squarepulse}(1800; 1)*0,07* \text{FAME} -\text{squarepulse}(1980; 1)*0,07* \text{FAME} \\
& -\text{squarepulse}(2160; 1)*0,07* \text{FAME} -\text{squarepulse}(2340; 1)*0,07* \text{FAME}
\end{aligned}$$

$-\text{squarepulse}(2520; 1)*0,07* \text{FAME} -\text{squarepulse}(2700; 1)*0,07* \text{FAME}$

$-\text{squarepulse}(2760; 1)*0,07* \text{FAME}$

Koncentracija izvora C (FAME):

$$\text{FAME} = \text{MFAME}/V$$

Diferencijalna jednačba za promjenu volumena podloge u reaktoru:

$$\begin{aligned} d/dt(V) = & \text{squarepulse}(360; 1)*0,0585 + \text{squarepulse}(540; 1)*0,0292 \\ & + \text{squarepulse}(720; 1)*0,0293 + \text{squarepulse}(900; 1)*0,0584 \\ & + \text{squarepulse}(1260; 1)*0,0586 + \text{squarepulse}(1800; 1)*0,0584 \\ & + \text{squarepulse}(2340; 1)*0,0585 + \text{squarepulse}(180; 1)*0,0079 \\ & + \text{squarepulse}(360; 1)*0,0048 + \text{squarepulse}(540; 1)*0,0147 \\ & + \text{squarepulse}(720; 1)*0,0163 + \text{squarepulse}(900; 1)*0,0316 \\ & + \text{squarepulse}(1080; 1)*0,0140 + \text{squarepulse}(1260; 1)*0,0263 \\ & - \text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(180; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(360; 1)*0,07 \\ & - \text{squarepulse}(540; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(720; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(900; 1)*0,07 \\ & - \text{squarepulse}(1080; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(1260; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(1440; 1)*0,07 \\ & - \text{squarepulse}(1620; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(1800; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(1980; 1)*0,07 \\ & - \text{squarepulse}(2160; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(2340; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(2520; 1)*0,07 \\ & - \text{squarepulse}(2700; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(2760; 1)*0,07 \end{aligned}$$

Koncentracije *mcl*-PHA ($C_6 - C_{12}$ frakcije):

$$C_6 = \text{PHA} * \text{FC}_6$$

$$C_7 = \text{PHA} * \text{FC}_7$$

$$C_8 = \text{PHA} * \text{FC}_8$$

$$C_9 = \text{PHA} * \text{FC}_9$$

$$C_{10} = \text{PHA} * \text{FC}_{10}$$

$$C_{12} = \text{PHA} * \text{FC}_{12}$$

Udjeli $C_6 - C_{12}$ monomera u *mcl*-PHA:

$$FC6 = 0,09016$$

$$FC7 = 0,0174$$

$$FC8 = 0,425$$

$$FC9 = 0,0283$$

$$FC10 = 0,291$$

$$FC12 = 0,058$$

Početni uvjeti:

$$INIT\ MXr = 3,877$$

$$INIT\ MNH4 = 2,16$$

$$INIT\ MPHA = 0,523$$

$$INIT\ V = 5$$

$$INIT\ MFAME = 50$$

Specifična brzina sinteze PHA:

$$q = q_{max} \cdot (FAME / (K_{fame} + FAME)) \cdot (K_{iNH4} / (K_{iNH4} + NH4))$$

Kinetičke konstante:

$$mi1_{max} = 0,003407$$

$$K_{fame} = 0,1$$

$$K_N = 0,05904$$

$$q_{max} = 0,0000924$$

$$K_{iNH4} = 0,12$$

Koeficijenti prinosa:

$$Y3 = 1,15$$

$$Y4 = 0,0367$$

$$Y5 = 0,2034$$

$$Y7 = 7,2$$

7.5. Program za matematičko modeliranje (simulaciju uzgoja) biosinteze PHA u stanicama *P. citronellolis* DSM 50332 – prvi uzgoj

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME = 4321

DT = 0,2

Masa ukupne suhe tvari biomase:

$MCDM = MXr + MPHA$

Koncentracija suhe tvari biomase:

$CDM = MCDM/V$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu rezidualne biomase (Xr):

$$\begin{aligned} d/dt(MXr) = & B - \text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(720; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(900; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(1080; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(1260; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(1440; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(1620; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(1800; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(1980; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(2160; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(2520; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(2880; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(3060; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(3240; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(3420; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(3600; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(3780; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(3960; 1)*0,07*Xr \\ & - \text{squarepulse}(4140; 1)*0,07*Xr - \text{squarepulse}(4320; 1)*0,07*Xr \end{aligned}$$

$B = mi1 * MXr$

Specifična brzina rasta:

$mi1 = mi1max * (FAME / (Kfame + FAME)) * (NH4 / (KN + NH4)) * (O2 / (KO2 + O2))$

Koncentracija rezidualne biomase:

$$X_r = M_{X_r}/V$$

Diferencijalna jednačina bilance mase za varijablu PHA:

$$\begin{aligned} d/dt(M_{PHA}) = & P - \text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(720; 1)*0,07*PHA \\ & - \text{squarepulse}(900; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(1080; 1)*0,07*PHA \\ & - \text{squarepulse}(1260; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(1440; 1)*0,07*PHA \\ & - \text{squarepulse}(1620; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(1800; 1)*0,07*PHA \\ & - \text{squarepulse}(1980; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(2160; 1)*0,07*PHA \\ & - \text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(2520; 1)*0,07*PHA \\ & - \text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(2880; 1)*0,07*PHA \\ & - \text{squarepulse}(3060; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(3240; 1)*0,07*PHA \\ & - \text{squarepulse}(3420; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(3600; 1)*0,07*PHA \\ & - \text{squarepulse}(3780; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(3960; 1)*0,07*PHA \\ & - \text{squarepulse}(4140; 1)*0,07*PHA - \text{squarepulse}(4320; 1)*0,07*PHA \end{aligned}$$

$$P = B*Y_4 + q*M_{X_r}$$

Koncentracija PHA (obzirom na volumen podloge):

$$PHA = M_{PHA}/V$$

Diferencijalna jednačina bilance mase za varijablu masu amonijaka:

$$\begin{aligned} d/dt(M_{NH_4}) = & \text{if time} \geq 1980 \text{ then } -m_{l1}*M_{X_r}/Y_7 - \text{squarepulse}(1980; 1)*0,07*NH_4 \\ & - \text{squarepulse}(2160; 1)*0,07*NH_4 - \text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*NH_4 \\ & - \text{squarepulse}(2520; 1)*0,07*NH_4 - \text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*NH_4 \\ & - \text{squarepulse}(2880; 1)*0,07*NH_4 - \text{squarepulse}(3060; 1)*0,07*NH_4 \\ & - \text{squarepulse}(3240; 1)*0,07*NH_4 - \text{squarepulse}(3420; 1)*0,07*NH_4 \\ & - \text{squarepulse}(3600; 1)*0,07*NH_4 - \text{squarepulse}(3780; 1)*0,07*NH_4 \\ & - \text{squarepulse}(3960; 1)*0,07*NH_4 - \text{squarepulse}(4140; 1)*0,07*NH_4 \\ & - \text{squarepulse}(4320; 1)*0,07*NH_4 \end{aligned}$$

else ($-mi1 * MXr / Y7 + Z + Z2 + Z3 + Z4 + Z5 + Z6$)

$-\text{squarepulse}(0,2; 1) * 0,07 * NH4 - \text{squarepulse}(720; 1) * 0,07 * NH4$

$-\text{squarepulse}(900; 1) * 0,07 * NH4 - \text{squarepulse}(1080; 1) * 0,07 * NH4$

$-\text{squarepulse}(1260; 1) * 0,07 * NH4 - \text{squarepulse}(1440; 1) * 0,07 * NH4$

$-\text{squarepulse}(1620; 1) * 0,07 * NH4 - \text{squarepulse}(1800; 1) * 0,07 * NH4$

$Z = \text{if time} < 720 \text{ then } 0,003 \text{ else } 0$

$Z2 = \text{if time} > 720 \text{ and time} < 1200 \text{ then } 0,0106 \text{ else } 0$

$Z6 = \text{if time} \geq 1200 \text{ and time} < 1440 \text{ then } 0,018 \text{ else } 0$

$Z3 = \text{if time} \geq 1440 \text{ and time} < 1620 \text{ then } 0,022 \text{ else } 0$

$Z4 = \text{if time} \geq 1620 \text{ and time} < 1800 \text{ then } 0,024 \text{ else } 0$

$Z5 = \text{if time} \geq 1800 \text{ and time} < 1980 \text{ then } 0,029 \text{ else } 0$

Koncentracija amonijaka:

$NH4 = MNH4 / V$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu masa izvora C (FAME):

$d/dt(MFAME) = ((-q * MXr) / Y5) - (mi1 * MXr) / Y3 + \text{squarepulse}(720; 1) * 25,4$

$+ \text{squarepulse}(1080; 1) * 25 + \text{squarepulse}(1440; 1) * 25,2$

$+ \text{squarepulse}(1800; 1) * 25,2 + \text{squarepulse}(2160; 1) * 25$

$+ \text{squarepulse}(2700; 1) * 25,2 + \text{squarepulse}(3060; 1) * 12,5$

$+ \text{squarepulse}(3420; 1) * 13 + \text{squarepulse}(3780; 1) * 12,6$

$+ \text{squarepulse}(3960; 1) * 12,8 + \text{squarepulse}(4140; 1) * 13,4$

$-\text{squarepulse}(0,2; 1) * 0,07 * FAME - \text{squarepulse}(720; 1) * 0,07 * FAME$

$-\text{squarepulse}(900; 1) * 0,07 * FAME - \text{squarepulse}(1080; 1) * 0,07 * FAME$

$-\text{squarepulse}(1260; 1) * 0,07 * FAME - \text{squarepulse}(1440; 1) * 0,07 * FAME$

$-\text{squarepulse}(1620; 1) * 0,07 * FAME - \text{squarepulse}(1800; 1) * 0,07 * FAME$

$-\text{squarepulse}(1980; 1) * 0,07 * FAME - \text{squarepulse}(2160; 1) * 0,07 * FAME$

$-\text{squarepulse}(2340; 1) * 0,07 * FAME - \text{squarepulse}(2520; 1) * 0,07 * FAME$

$-\text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*\text{FAME} -\text{squarepulse}(2880; 1)*0,07*\text{FAME}$
 $-\text{squarepulse}(3060; 1)*0,07*\text{FAME} -\text{squarepulse}(3240; 1)*0,07*\text{FAME}$
 $-\text{squarepulse}(3420; 1)*0,07*\text{FAME} -\text{squarepulse}(3600; 1)*0,07*\text{FAME}$
 $-\text{squarepulse}(3780; 1)*0,07*\text{FAME} -\text{squarepulse}(3960; 1)*0,07*\text{FAME}$
 $-\text{squarepulse}(4140; 1)*0,07*\text{FAME} -\text{squarepulse}(4320; 1)*0,07*\text{FAME}$

Koncentracija izvora C (FAME):

$\text{FAME} = \text{MFAME}/V$

Diferencijalna jednačba za promjenu volumena podloge u reaktoru:

$d/dt(V) = \text{squarepulse}(720; 1)*0,02965 +\text{squarepulse}(1080; 1)*0,029185$
 $+ \text{squarepulse}(1440; 1)*0,02942 +\text{squarepulse}(1800; 1)*0,02942$
 $+ \text{squarepulse}(2160; 1)*0,029185 +\text{squarepulse}(2700; 1)*0,02942$
 $+ \text{squarepulse}(3060; 1)*0,01459 +\text{squarepulse}(3420; 1)*0,01518$
 $+ \text{squarepulse}(3780; 1)*0,01471 +\text{squarepulse}(3960; 1)*0,01494$
 $+ \text{squarepulse}(4140; 1)*0,01564$
 $+ \text{squarepulse}(720; 1)*0,00879 +\text{squarepulse}(1620; 1)*0,001319$
 $+ \text{squarepulse}(1800; 1)*0,004945$
 $-\text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(720; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(900; 1)*0,07$
 $-\text{squarepulse}(1080; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(1260; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(1440; 1)*0,07$
 $-\text{squarepulse}(1620; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(1800; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(1980; 1)*0,07$
 $-\text{squarepulse}(2160; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(2340; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(2520; 1)*0,07$
 $-\text{squarepulse}(2700; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(2880; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(3060; 1)*0,07$
 $-\text{squarepulse}(3240; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(3420; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(3600; 1)*0,07$
 $-\text{squarepulse}(3780; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(3960; 1)*0,07 -\text{squarepulse}(4140; 1)*0,07$
 $-\text{squarepulse}(4320; 1)*0,07$

Koncentracije *mcl*-PHA ($C_6 - C_{12}$ frakcije):

$C_6 = \text{PHA}*\text{FC}_6$

$$C7 = PHA * FC7$$

$$C8 = PHA * FC8$$

$$C9 = PHA * FC9$$

$$C10 = PHA * FC10$$

$$C12 = PHA * FC12$$

Udjeli $C_6 - C_{12}$ monomera u *mcl*-PHA:

$$FC6 = 0,05559$$

$$FC7 = 0,0194$$

$$FC8 = 0,3945$$

$$FC9 = 0,058$$

$$FC10 = 0,3926$$

$$FC12 = 0,08717$$

Koncentracija kisika:

$$O2 = O21 + O22 + O23$$

$$O21 = \text{if time} < 1300 \text{ then } 0,0032 \text{ else } 0$$

$$O22 = \text{if time} \geq 1300 \text{ and time} \leq 2500 \text{ then } ((-0,00000134 * \text{TIME}) + 0,004942) \text{ else } 0$$

$$O23 = \text{if time} > 2500 \text{ then } 0,0016 \text{ else } 0$$

Početni uvjeti:

$$\text{INIT MXr} = 6,2645$$

$$\text{INIT MNH4} = 1,98158$$

$$\text{INIT MPHA} = 1,2855$$

$$\text{INIT V} = 5$$

$$\text{INIT MFAME} = 25$$

Specifična brzina sinteze PHA:

$$q = q_{\max} * (FAME / (K_{\text{fame}} + FAME)) * (K_{\text{NH4}} / (K_{\text{NH4}} + \text{NH4}))$$

Kinetičke konstante:

$$mi1_{max} = 0,0037$$

$$K_{fame} = 1,18$$

$$KN = 0,05904$$

$$q_{max} = 0,00005077$$

$$K_{iNH4} = 0,000001$$

$$K_{O2} = 0,0017$$

Koeficijenti prinosa:

$$Y_3 = 1,14$$

$$Y_4 = 0,018$$

$$Y_5 = 0,0868$$

$$Y_7 = 5,5$$

7.6. Program za matematičko modeliranje (simulaciju uzgoja) biosinteze PHA u stanicama *P. citronellolis* DSM 50332 – drugi uzgoj

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME = 2701

DT = 0,2

Masa ukupne suhe tvari biomase:

$$MCDM = MX_r + M_{PHA}$$

Koncentracija suhe tvari biomase:

$$CDM = MCDM/V$$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu rezidualne biomase (X_r):

$$\begin{aligned} d/dt(MX_r) = & B - \text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07*X_r - \text{squarepulse}(180; 1)*0,07*X_r \\ & - \text{squarepulse}(900; 1)*0,07*X_r - \text{squarepulse}(1140; 1)*0,07*X_r \\ & - \text{squarepulse}(1380; 1)*0,07*X_r - \text{squarepulse}(1620; 1)*0,07*X_r \\ & - \text{squarepulse}(1860; 1)*0,07*X_r - \text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*X_r \end{aligned}$$

$$-\text{squarepulse}(2580; 1)*0,07*Xr -\text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*Xr$$

$$B = mi1 * MXr$$

Specifična brzina rasta:

$$mi1 = mi1max*(FAME/(Kfame+FAME))*(NH4/(KN+NH4))*(O2/(KO2+O2))$$

Koncentracija rezidualne biomase:

$$Xr = MXr/V$$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu PHA:

$$\begin{aligned} d/dt(MPHA) = & P -\text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07*PHA -\text{squarepulse}(180; 1)*0,07*PHA \\ & -\text{squarepulse}(900; 1)*0,07*PHA -\text{squarepulse}(1140; 1)*0,07*PHA \\ & -\text{squarepulse}(1380; 1)*0,07*PHA -\text{squarepulse}(1620; 1)*0,07*PHA \\ & -\text{squarepulse}(1860; 1)*0,07*PHA -\text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*PHA \\ & -\text{squarepulse}(2580; 1)*0,07*PHA -\text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*PHA \end{aligned}$$

$$P = B*Y4 + q*MXr$$

Koncentracija PHA (obzirom na volumen podloge):

$$PHA = MPHA/V$$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu masa amonijaka:

$$\begin{aligned} d/dt(MNH4) = & \text{if time} \geq 1620 \text{ then } -mi1*MXr/Y7 -\text{squarepulse}(1620; 1)*0,07*NH4 \\ & -\text{squarepulse}(1860; 1)*0,07*NH4 -\text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*NH4 \\ & -\text{squarepulse}(2580; 1)*0,07*NH4 -\text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*NH4 \\ & \text{else (} -mi1*MXr/Y7 +Z+Z2+ Z3+Z6) \\ & -\text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07*NH4 -\text{squarepulse}(180; 1)*0,07*NH4 \\ & -\text{squarepulse}(900; 1)*0,07*NH4 -\text{squarepulse}(1140; 1)*0,07*NH4 \\ & -\text{squarepulse}(1380; 1)*0,07*NH4 \end{aligned}$$

$$Z = \text{if time} < 180 \text{ then } 0,005 \text{ else } 0$$

$$Z2 = \text{if time} > 180 \text{ and time} < 900 \text{ then } 0,009 \text{ else } 0$$

$$Z6 = \text{if time} \geq 900 \text{ and time} < 1140 \text{ then } 0,0165 \text{ else } 0$$

$Z3 = \text{if time} \geq 1140 \text{ and time} < 1380 \text{ then } 0,022 \text{ else } 0$

Koncentracija amonijaka:

$NH4 = MNH4/V$

Diferencijalna jednačba bilance mase za varijablu masa izvora C (FAME):

$$\begin{aligned} d/dt(MFAME) = & ((-q*MXr)/Y5) -(mi1*MXr)/Y3 + \text{squarepulse}(180; 1)*18,8 \\ & + \text{squarepulse}(900; 1)*37,6 + \text{squarepulse}(1140; 1)*18,6 \\ & + \text{squarepulse}(1380; 1)*50 + \text{squarepulse}(1620; 1)*25,2 \\ & + \text{squarepulse}(1860; 1)*50 + \text{squarepulse}(2340; 1)*50 \\ & + \text{squarepulse}(2580; 1)*25,2 \\ & - \text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07*FAME - \text{squarepulse}(180; 1)*0,07*FAME \\ & - \text{squarepulse}(900; 1)*0,07*FAME - \text{squarepulse}(1140; 1)*0,07*FAME \\ & - \text{squarepulse}(1380; 1)*0,07*FAME - \text{squarepulse}(1620; 1)*0,07*FAME \\ & - \text{squarepulse}(1860; 1)*0,07*FAME - \text{squarepulse}(2340; 1)*0,07*FAME \\ & - \text{squarepulse}(2580; 1)*0,07*FAME - \text{squarepulse}(2700; 1)*0,07*FAME \end{aligned}$$

Koncentracija izvora C (FAME):

$FAME = MFAME/V$

Diferencijalna jednačba za promjenu volumena podloge u reaktoru:

$$\begin{aligned} d/dt(V) = & \text{squarepulse}(180; 1)*0,02 + \text{squarepulse}(900; 1)*0,04 + \text{squarepulse}(1140; 1)*0,02 \\ & + \text{squarepulse}(1380; 1)*0,06 + \text{squarepulse}(1620; 1)*0,03 + \text{squarepulse}(1860; 1)*0,06 \\ & + \text{squarepulse}(2340; 1)*0,06 + \text{squarepulse}(2580; 1)*0,03 \\ & + \text{squarepulse}(720; 1)*0,00879 + \text{squarepulse}(1620; 1)*0,001319 \\ & + \text{squarepulse}(1800; 1)*0,004945 \\ & - \text{squarepulse}(0,2; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(180; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(900; 1)*0,07 \\ & - \text{squarepulse}(1140; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(1380; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(1620; 1)*0,07 \\ & - \text{squarepulse}(1860; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(2340; 1)*0,07 - \text{squarepulse}(2580; 1)*0,07 \\ & - \text{squarepulse}(2700; 1)*0,07 \end{aligned}$$

Koncentracije *mcl*-PHA ($C_6 - C_{12}$ frakcije):

$$C_6 = \text{PHA} * \text{FC}_6$$

$$C_7 = \text{PHA} * \text{FC}_7$$

$$C_8 = \text{PHA} * \text{FC}_8$$

$$C_9 = \text{PHA} * \text{FC}_9$$

$$C_{10} = \text{PHA} * \text{FC}_{10}$$

$$C_{12} = \text{PHA} * \text{FC}_{12}$$

Udjeli $C_6 - C_{12}$ monomera u *mcl*-PHA:

$$\text{FC}_6 = 0,0635$$

$$\text{FC}_7 = 0,0178$$

$$\text{FC}_8 = 0,423$$

$$\text{FC}_9 = 0,0276$$

$$\text{FC}_{10} = 0,343$$

$$\text{FC}_{12} = 0,0697$$

Koncentracija kisika:

$$\text{O}_2 = \text{O}_{21} + \text{O}_{22} + \text{O}_{23}$$

$$\text{O}_{21} = \text{if time} < 1300 \text{ then } 0,0032 \text{ else } 0$$

$$\text{O}_{22} = \text{if time} \geq 1300 \text{ and time} \leq 2500 \text{ then } ((-0,00000134 * \text{TIME}) + 0,004942) \text{ else } 0$$

$$\text{O}_{23} = \text{if time} > 2500 \text{ then } 0,0016 \text{ else } 0$$

Početni uvjeti:

$$\text{INIT MXr} = 15,8935$$

$$\text{INIT MNH}_4 = 2,09$$

$$\text{INIT MPHA} = 2,2$$

$$\text{INIT V} = 5$$

$$\text{INIT MFAME} = 37,5$$

Specifična brzina sinteze PHA:

$$q = q_{\max} \cdot (FAME / (K_{fame} + FAME)) \cdot (K_{iNH_4} / (K_{iNH_4} + NH_4))$$

Kinetičke konstante:

$$m_{l\max} = 0,003$$

$$K_{fame} = 1,18$$

$$K_N = 0,05904$$

$$q_{\max} = 0,0001$$

$$K_{iNH_4} = 0,030001$$

$$K_{O_2} = 0,0017$$

Koeficijenti prinosa:

$$Y_3 = 1,14$$

$$Y_4 = 0,009$$

$$Y_5 = 0,0868$$

$$Y_7 = 5,5$$